

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Prevalencia de genotipos de pili tipo iv y factores de
virulencia asociados en aislados clínicos de
*pseudomonas aeruginosa***

TESIS

**Para optar el Grado Académico de Doctora
en Farmacia y Bioquímica**

AUTOR

Maria Elena Salazar Salvatierra

Lima – Perú

2014

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación	
Problemática.....	1
1.2 Formulación del problema.....	3
1.3 Justificación Teórica.....	4
1.4 Justificación Práctica.....	4
1.5 Objetivos.....	5

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Marco Epistemológico de la investigación.....	6
2.2 Antecedentes de la investigación.....	6
2.3 Bases Teóricas.....	8
2.3.1 Género <i>Pseudomonas</i>	8
2.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.3.3 Factores de Virulencia.....	10
2.3.3.1 Formación de Biopelículas.....	11
2.3.3.2 Movilidad.....	16
2.3.3.2.1 Flagelos.....	17
2.3.3.2.2 Pili Tipo IV.....	20
2.3.3.2.2.1 Genotipos de Pila.....	29
2.3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	30

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA.....33

3.1 Tipo de Estudio.....	33
3.2 Lugar de Ejecución.....	33
3.3 Muestras.....	33
3.4 Recolección de Muestras.....	33

3.5 Identificación Microbiológica.....	33
3.5.1 Observación de Morfología celular.....	33
3.5.2 Crecimiento en agar sangre y agar cetrimide.....	33
3.5.3 Prueba de oxidasas.....	34
3.6 Sensibilidad Antimicrobiana.....	34
3.7 Capacidad de producción de Biopelículas.....	34
3.8 Evaluación del Tipo de Movilidad	
3.8.1 Evaluación de la movilidad tipo “nado”.....	34
3.8.2 Evaluación de la movilidad tipo “enjambre”.....	34
3.8.3 Evaluación de la movilidad tipo “contracción”.....	35
3.9 Extracción de ADN.....	35
3.10 PCR para la amplificación de la región comprendida entre pilB y tARN-Thr.....	36
3.11 PCR para los genes accesorios.....	37
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	65

ABREVIATURAS

ADN, Ácido desoxirribonucleico

CDC, Centro de Control de Enfermedades

CVC, catéter venoso central

INS, Instituto Nacional de Salud

FQ, fibrosis quística

OMS, Organización Mundial de la Salud

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

QS, *quorum sensing*

T4P, pili tipo IV

TLR5, receptor de linfocitos T tipo 5

TSA, agar tripticasa de soya

TTSS, sistema de secreción tipo III

UCI, unidad de cuidados intensivos

UFC, unidades formadoras de colonias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de una biopelícula de <i>P. aeruginosa</i>	14
Figura 2. Movimiento bacteriano por diferentes mecanismos.....	17
Figura 3. Ensamblaje del pili de <i>Neisseria</i> como ejemplo del T4P.....	23
Figura 4. Estructura de la T4P de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
Figura 5. PilA y gen(es) accesorio(s) asociado(s) en <i>P. aeruginosa</i>	29

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura de los componentes clave en la biogénesis del pili tipo IV.....	24
Tabla 2. Comparación de las pilinas tipo IVa y IVb en bacterias gram negativas.....	25
Tabla 3. Perfiles de sensibilidad antimicrobiana de cepas aisladas de <i>P. aeruginosa</i>	38
Tabla 4. Distribución de resistencia antimicrobiana de los aislados de <i>P. aeruginosa</i>	40
Tabla 5. Evaluación de la formación de bioepículas y tipos de motilidad.....	45
Tabla 6. Presencia de genotipos de T4P en <i>P. aeruginosa</i>	49
Tabla 7. Distribución de genotipos de pilina entre los diferentes aislados clínicos.....	50

LISTA DE FOTOS

Foto 1. Capacidad de formación de biopelículas	40
Foto 2. Capacidad de formación de biopelículas	41
Foto 3 y 4. Motilidad tipo “nado”	42
Foto 5 y 6. Motilidad tipo “enjambre”	43
Foto 7 y 8. Motilidad tipo “contracción”	44
Foto 9 y 10. Gen pil A amplificado	47
Foto 11 y 12. Genes accesorios amplificados	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Capacidad de formación de biopelículas	41
Gráfico 2. Distribución de genotipos de pilina	51

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un importante patógeno oportunista del ser humano y tiene amplia versatilidad metabólica por lo que se puede adaptar a vivir en ambientes ubicuos, pudiendo persistir en ciertas superficies como tejidos formando comunidades especializadas llamadas biopelículas, además de elaborar otros factores de virulencia, como el pili tipo IV (T4P) vinculado no sólo a la motilidad llamada “contracción” sino también pareciera estar relacionada con las etapas tempranas en la formación de las biopelículas.

La presente tesis tuvo como principal objetivo determinar la presencia de los diferentes genotipos del T4P así como los factores de virulencia asociados en cepas clínicas de diferentes fuentes, encontrando que la distribución de genotipos fue 25,9 % para el Grupo II, 19 % para el Grupo I, 24,1 % para el Grupo III, 10,3 % el Grupo IV y 20,7 % para el Grupo V, de tal manera que en nuestro medio existe distribución homogénea de los diversos genotipos.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, Genotipos de pilA, Motilidad

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic human pathogen and has a broad metabolic versatility so it can adapt to living in ubiquitous environments, so can persist on surfaces as some tissues forming specialized bacterial communities called biofilms, in addition to developing other virulence factors, as type IV pilus (T4P) linked not only to motility called “Twitching” but also seems to be related to the early stages in biofilm formation. The present thesis had as main objective to determine the presence of different genotypes of T4P and associated virulence factors in clinical strains from different sources, finding that the distribution of genotypes is, 25,9% for group II, the 19% for group I, the 24,1% for group III, the 10,3% for group IV and 20,7 % for group V, so in our country there is an homogenous distribution of the diverse genotypes.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, pilA genotypes, motility

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa que se encuentra en numerosos nichos ecológicos, incluyendo agua, suelo y plantas. El éxito de esta bacteria para poder vivir en varios ambientes se atribuye a su amplia versatilidad metabólica y a la elaboración de numerosos factores de virulencia y supervivencia secretados y asociados a gran cantidad de células ¹.

Las infecciones causadas por éste patógeno oportunista, pueden ser ampliamente clasificadas en infecciones agudas y crónicas². Las infecciones agudas se caracterizan a menudo por un rápido crecimiento, movilidad, citotoxicidad y rápida progresión de la enfermedad. Por el contrario, las enfermedades crónicas se cree que están asociadas con un crecimiento lento, formación de biopelículas, resistencia a antibióticos y persistencia³. Esta bacteria es un microorganismo modelo para la formación de biopelículas, este proceso *in vitro* es altamente regulado a través de una serie de etapas, las cuales pueden ser divididas en: adhesión inicial, formación de la microcolonia, maduración y dispersión, pudiéndose liberar células plactónicas al ambiente ⁴.

Además, *Pseudomonas aeruginosa* participa en infecciones polimicrobianas así, los estudios de su prevalencia indican que está presente incluso en el 15-80 % de heridas crónicas, dependiendo del tipo de herida, técnica de muestreo y la metodología empleada para la identificación bacteriana. La alta prevalencia podría deberse a que esta bacteria ocupa sitios profundos dentro de la herida, dificultando la identificación a través de las técnicas de muestreo convencionales. Las heridas crónicas en las que esta bacteria está implicada, son más severas y la curación es muy lenta y prolongada, lo que podría ser por interacciones sinérgicas con otras bacterias, como gram positivas ⁵. Otras infecciones a las cuales también se asocia son neumonía e infecciones del torrente sanguíneo y tracto urinario ⁶.

Esta bacteria, permanece entre los principales patógenos oportunistas y nosocomiales resistentes a antibióticos, que son la causa principal de morbilidad y mortalidad entre los pacientes de cuidados intensivos o inmunocomprometidos, causando generalmente bacteriemia y neumonía ⁷. Elabora una amplia variedad de factores de virulencia incluyendo adhesinas y toxinas. Una de las adhesinas más significativa, el pili polar tipo IV, T4P, es importante en las interacciones bacteria-célula hospedera y para la movilidad tipo “contracción”, la que es el único mecanismo de propulsión en superficie ⁷. Parecería también que está relacionada con la segunda etapa en la formación de biopelículas, como es la adhesión irreversible ⁸.

De acuerdo con el reporte de la NNISS (National Nosocomial Infections Surveillance System) de Estados Unidos y el INICC (International Nosocomial Infection Control Consortium), *P. aeruginosa* es el patógeno más común encontrado en las salas de cuidados intensivos atribuyéndole infecciones del tracto respiratorio y de torrente sanguíneo primario asociados al uso del catéter venoso central. Además, el reporte del programa SENTRY en Latinoamérica durante los años 1997-2000 mostró que esta bacteria fue el patógeno nosocomial más comúnmente aislado de pacientes hospitalizados con neumonía, teniendo alta resistencia frente a la mayoría de los antimicrobianos evaluados ⁹. Y, probablemente, ésta bacteria provenga de la microflora endógena del paciente y/o del ambiente ⁶.

P. aeruginosa es también uno de los patógenos nosocomiales más importantes en los servicios de neonatología, ocupando los primeros lugares en frecuencia de los aislamientos durante brotes de infecciones intrahospitalarias; en las unidades de pacientes quemados y en las de cuidados intensivos neonatales es frecuente en casos de bacteriemias, diarreas y neumonías, infecciones que se han asociado a la contaminación por fuentes comunes como grifos de agua, lavatorios, detergentes y antisépticos, equipos y procedimientos usados. Se han descrito como posibles reservorios de esta bacteria incubadoras contaminadas, equipos de terapia respiratoria y lavatorios, cunas en unidades de cuidados intensivos neonatales y sumideros de bañeras donde además después de habérsela aislado se las ha clasificado como multidrogorresistente ¹⁰.

En el Perú, en un informe presentado por el Instituto Nacional de Salud (INS) donde se consolida la información de diferentes hospitales del Ministerio de Salud

(MINSA) y EsSalud durante el período 2002-2007, incluye a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* como las bacterias de más frecuente aislamiento. Siendo *P. aeruginosa* uno de los microorganismos frecuentemente causante de infecciones intrahospitalarias, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), lo que aumenta las tasas de mortalidad, probablemente debido a que muestra alta resistencia frente a todos los antibióticos vigilados ¹¹.

El Hospital Nacional Hipólito Unanue reportó en el 2011 que *P. aeruginosa* ocupa el cuarto lugar en el mapa microbiológico ¹². En el Hospital Nacional E. Rebagliati M. en el 2008, se estudiaron 20 pacientes con fibrosis quística, de los cuales el 40 % fueron niños entre los 4 y 7 años, y el microorganismo infectante inicial fue *Pseudomonas aeruginosa* en 35 % de los casos, en el 46 % de éstos casos fue causante de la colonización crónica, falleciendo 7 pacientes (35 %). En el 72 % de los casos, la causa de fallecimiento fue por insuficiencia respiratoria asociada a sepsis por *P. aeruginosa* ¹³.

Sin embargo, es necesario realizar estudios no sólo monitoreando su preocupante potencial epidémico, sino también para conocer más acerca de sus estrategias para producir enfermedad y así poder introducir medidas de prevención y control que ayuden al manejo de posibles brotes.

1.2 Formulación del Problema

Por lo mencionado, es necesario que se realicen trabajos de investigación sobre éste patógeno oportunista, con incidencia en los factores de virulencia que utiliza como son, entre otros, su motilidad y la formación de biopelículas. Por ello, en el presente trabajo, se estudió la distribución de los alelos que codifican la pilina del Pili Tipo IV así como la formación de biopelículas, y el tipo de motilidad, asociados a su presencia, de tal manera que se disponga de un registro que sirva como data para el posterior diseño de fármacos y vacunas que tengan como “blanco” dicha estructura. Por ello nos formulamos la siguiente pregunta:

¿Cuáles son los alelos de Pili Tipo IV y los factores de virulencia asociados que prevalecen en los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*?

1.3 Justificación Teórica

La expresión de genes de virulencia en una infección dada es de principal importancia en la determinación de la capacidad de un aislado clínico individual de esta bacteria para que se establezca y mantenga la infección y, numerosos estudios han encontrado potenciales asociaciones entre la presencia o ausencia de factores de virulencia y diferentes tipos de infección. Cada estudio difiere en el gen o factor de virulencia estudiado, el número de cepas estudiadas, el lugar y tiempo, por lo que las dudas aún continúan respecto al rol que juegan los factores de virulencia individuales en determinar el tipo de infección causada.

Es por ello, que la detección y distribución de los genotipos que codifican la pilina del pili Tipo IV y de los factores de virulencia relacionados, como son la formación de biopelículas, y el tipo de motilidad, que se han encontrado en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* en nuestra capital permitirán contribuir a sentar las bases fundamentales para establecer el patrón de distribución de genotipos asociados a enfermedades y de esta manera tener información para el diseño de posibles fármacos o vacunas basadas en la presencia del pili Tipo IV.

1.4 Justificación Práctica

Los tratamientos tradicionales de las infecciones bacterianas están basados en compuestos que matan o inhiben el crecimiento microbiano, el inconveniente es que cada día aumentan las bacterias que desarrollan mecanismos de resistencia frente a antibióticos. A esto se aúna que las bacterias que forman biopelículas son las menos afectadas por los antimicrobianos comparadas con las cepas plactónicas de las mismas especies, lo cual podría deberse a la transferencia de genes de resistencia que se da de manera exacerbada dentro de esas comunidades.

Es por ello, que las investigaciones se están dirigiendo al desarrollo de sustancias que inhiban específicamente la virulencia bacteriana. Tales drogas “antipatogénicas”, en contraste con las antibacterianas, no matan a las bacterias o detienen su crecimiento y por lo tanto, se asume que no llevan a generar cepas resistentes. Dichas investigaciones se dirigen a la búsqueda de la inhibición de los sistemas que gobiernan la expresión de una serie de factores de virulencia, por ejemplo, terapia

antiadhesión, inhibición de la señalización célula-célula, inhibir la formación de biopelículas, etc. Por lo que, conociendo más sobre cada factor de virulencia de un determinado patógeno, como *P. aeruginosa*, se está contribuyendo en la búsqueda de nuevas herramientas que servirán para disminuir la morbilidad y mortalidad por este agente patógeno.

1.5 Objetivos

Objetivo General:

Determinar los genotipos que codifican el pili Tipo IV en los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* y los factores de virulencia asociados que prevalecen.

Objetivos Específicos:

- Aislar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de muestras de pacientes hospitalizados.
- Realizar el perfil de resistencia de las cepas aisladas.
- Evaluar la capacidad de formación de biopelículas.
- Evaluar los diferentes tipos de motilidad en cada cepa aislada.
- Determinar los genes que codifican el Pili tipo IV en las cepas aisladas.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Marco Epistemológico de la Investigación

Popper establece que existe la teoría de los tres mundos, el primero contiene a los objetos físicos, en el segundo se encuentra el conocimiento subjetivo y en el tercero está el conocimiento objetivo, representado por estructuras teóricas, problemas científicos, conceptos, hipótesis y principalmente los argumentos científicos¹⁴. Aplicando estos conceptos, se podría decir que en el conocimiento de la salud, específicamente en el conocimiento de patógenos, existen diversos resultados logrados a través del método científico, y que son útiles para toda la comunidad científica, de tal manera que cada uno contribuye a resolver el gran problema de control para prevención de enfermedades y para el diseño de nuevos fármacos.

El concepto de ciencia como el “conocimiento ordenado y mediato de los seres y sus propiedades, por medio de sus causas”¹⁵, ya que investiga qué son las cosas, cómo actúan, se relacionan, cuándo, dónde, por qué, etc. La microbiología como ciencia refleja la necesidad de conocer cada día más a los microorganismos con el principal fin de poder controlarlos, pues si bien a lo largo del tiempo han habido algunas interacciones positivas como su aprovechamiento en fermentaciones, lixiviación y otros, muchos microorganismos han aprendido a adaptarse a otros hábitats pero a costa de su hospedador, para el caso de la bacteria objeto de esta tesis aún más, ya que es una bacteria ubicua en agua y ambientes pero si se da la oportunidad puede vivir en el ser humano causando enfermedades de difícil tratamiento. En este contexto la ciencia se ha constituido en un instrumento eficiente para desarrollar soluciones frente a problemas que han ido tornándose de vital importancia para la salud del hombre y para la sociedad en que vive, pues tomada en su conjunto trata de responder a las necesidades del hombre.

2.2 Antecedentes de Investigación

Kus J. et al. en el 2004, estudiaron aislados de *P. aeruginosa* provenientes de ambientes y muestras clínicas revelando la prevalencia de los genes para pilina

pertenecientes al grupo I en pacientes con fibrosis quística, concluyendo que podría conferirle una ventaja de colonización y persistencia en el hospedero ⁷.

Emam A. et al. en el 2006, investigaron el rol potencial de la heterogeneidad de T4P en la patología clínica demostrando que en *P. aeruginosa* la unión a la célula es mediada por el pili tipo IV, pues los mutantes que carecían de pili pero no de flagelo fueron incapaces de unirse a dichas células ¹⁶.

Mikkelsen H. et al. en el 2007, demostraron que *P. aeruginosa* es un organismo modelo de la formación de biopelículas. Las infecciones agudas son a menudo asociadas a células libres, alta virulencia y crecimiento rápido, mientras que las infecciones crónicas son asociadas con el crecimiento en biopelícula, baja virulencia y crecimiento lento que es similar a las células plactónicas en fase estacionaria. Sus resultados muestran que las biopelículas expresan un sistema de secreción tipo III, mientras que las contrapartes plactónicas no ¹⁷.

Miller R et al. en el 2008, demostraron que el pili tipo IV media la motilidad tipo “contracción” direccional en una gradiente de fosfatidiletanolamina. Mientras que Mulcahy et al. el mismo año, demostraron la habilidad de ésta bacteria para causar un amplio rango de infecciones en humanos, debido en parte a su adaptabilidad y su capacidad para regular la expresión de genes clave de virulencia en respuesta a condiciones ambientales específicas ¹⁸.

Craig L y Li J. en el 2008, también mencionan la amplia variedad de funciones del pili tipo IV, como son adhesión, motilidad, formación de microcolonias, secreción de proteasas y factores de colonización. Su presencia en la superficie de muchas bacterias patógenas, su rol vital en la virulencia y su habilidad para evadir el sistema inmune hacen que ésta estructura sea relevante para estudios como blanco de vacunas y terapias ¹⁹.

Murray T et al. en el 2010, presentaron su estudio de *P. aeruginosa* aisladas de 237 pacientes pediátricos y adultos del Hospital Yale-New Haven, Estados Unidos, demostrando que las cepas objeto de su estudio mostraban cierta asociación entre la manifestación de los variados fenotipos de motilidad, sistema de secreción y de formación de biopelículas ²⁰.

Conrad J. en el 2012 hace una revisión de estudios de la motilidad bacteriana llevada a cabo por el flagelo y el pili tipo IV en el contexto de la formación de biopelículas. Describe los mecanismos de motilidad que las bacterias desarrollan de manera independiente así como las interacciones entre los diferentes apéndices de motilidad con los fluidos y las superficies, así como la adhesión y dispersión de la bacteria en superficies antes de la formación de biopelículas ²¹.

Kim S. et al. en el 2012 aislaron un fago lítico de *P. aeruginosa* que requiere del pili tipo IV para la infección. Este fago tiene amplio espectro bactericida, sobre gram positivos y gram negativos, pudiendo erradicar células dentro de la biopelícula, por ello, está siendo estudiado como agente terapéutico ²².

2.3 Bases Teóricas

2.3.1 Género *Pseudomonas*

Pseudomonas y otros bacilos no fermentadores constituyen un complejo grupo de patógenos oportunistas de plantas, animales y del ser humano. Para complicar la comprensión de estos microorganismos, la clasificación taxonómica ha sufrido numerosos cambios en los últimos años ²³.

Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* (llamadas también pseudomonas) son microorganismos ubicuos que se encuentran en la tierra, en la materia orgánica en descomposición, en la vegetación y en el agua. Además, se hallan también en el ambiente hospitalario y en ambientes húmedos como los alimentos, las flores de los jarrones, los lavaderos, baños, respiradores y los equipos de diálisis, e incluso en las soluciones desinfectantes. Es poco frecuente que forme parte de manera persistente de la flora microbiana normal del ser humano, excepto en los pacientes hospitalizados y en los pacientes ambulatorios inmunodeprimidos ²³. Los análisis genómicos comparativos de múltiples cepas han identificado secuencias compartidas y accesorias (variable en las distintas cepas), indicando la evidencia que los genes accesorios codifican funciones asociadas con la adaptación y diversificación de cada nicho ²⁴.

Las necesidades tan sencillas para su crecimiento y la versatilidad nutricional de éste género hacen posible su amplia distribución ambiental. Son capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno y algunas cepas crecen incluso en agua destilada al degradar los restos de los nutrientes²³.

Las diversas especies poseen una amplia variedad de factores estructurales, enzimas y toxinas que aumentan su virulencia, a la vez que las hacen resistentes a los antibióticos que se usan con mayor frecuencia. Las infecciones por pseudomonas son fundamentalmente oportunistas, es decir, restringidas a los pacientes con alteraciones en los mecanismos de defensa. Esta característica destaca la importancia de la capacidad del anfitrión para prevenir la colonización y evitar una posterior invasión por estas bacterias²³.

Fisiología y Estructura

Son bacilos gram negativos móviles rectos o ligeramente curvados (0.5 - 1 x 1.5 - 5 µm) que suelen disponerse en parejas. Estos microorganismos no son fermentadores y utilizan los hidratos de carbono a través del metabolismo respiratorio donde el oxígeno actúa como aceptor final de electrones. Aunque se definen como aerobios estrictos, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitrato o arginina como aceptor final de electrones. La presencia de citocromo oxidasa (detectada por medio de una prueba rápida de 5 minutos) se utiliza para distinguirlas de las enterobacterias. Algunas especies adquieren un aspecto mucoso como consecuencia de la abundancia de polisacáridos capsulares; estas cepas son especialmente frecuentes en los pacientes con fibrosis quística. Algunas producen pigmentos difusibles²³.

Aunque el género estuvo formado en otros tiempos por un gran número de especies, la mayoría de ellas se ha reclasificado en otros géneros, por lo que aquel se compone actualmente sólo de unas 10 especies que se han aislado a partir de muestras clínicas así como numerosas especies que se desarrollan en la naturaleza. *Pseudomonas aeruginosa* es la pseudomona más frecuente²³.

2.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa tiene el genoma más grande entre las bacterias más conocidas, consta de 6.3 millones de pares de bases (Mpb) y contiene 5570 genes ²⁵ contribuyendo a su extraordinaria versatilidad, adaptabilidad y virulencia, por lo que es asociada con infecciones agudas y crónicas en humanos. Muchos factores de virulencia han sido identificados usando animales modelos de infección, incluyendo aquellos que permiten a la bacteria moverse, adherirse y colonizar de manera efectiva los tejidos de mamíferos así como secretar enzimas y toxinas que le permiten cruzar las barreras de los tejidos y evadir las defensas del sistema inmune ²⁰.

Esta bacteria raramente infecta tejidos no comprometidos, pero los huéspedes que son objetivos son aquellos con algunas predisposiciones como los que padecen leucemia, linfoma, fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, SIDA y quemaduras ²⁶, aunque algunos reportes recientes señalan que también puede causar infecciones en hospederos sanos. Hay evidencias que no existe mucha diferencia entre la virulencia de los aislados clínicos y ambientales, presentando ambos muchos factores de virulencia en común ²⁷.

Además, *P. aeruginosa* es la causa más común de neumonías asociadas a UCI y es responsable de aproximadamente 10 % de los 2 millones de infecciones nosocomiales que ocurren anualmente ²⁶. Su virulencia es multifactorial y combinatoria, y varía substancialmente dependiendo de la fisiología bacteriana y de la cepa involucrada.

2.3.3 Factores de Virulencia

Los factores de virulencia pueden ser químicos o proteináceos y asociados a las células o secretados. Los factores de virulencia proteináceos son a menudo secretados a través de uno de los cinco sistemas de secreción proteica. El sistema de secreción tipo III (TTSS), el cual inyecta proteínas efectoras directamente en el citoplasma de la célula hospedera eucariótica, ha sido asociado a una alta virulencia de esta bacteria ²⁸, sobretodo en infecciones a la córnea, piel, vías respiratorias y también en infecciones sistémicas ²⁹. Otros, son expresados a través de mecanismos dependientes de la densidad celular como es el “quórum sensing” ²⁷.

Entre algunos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* tenemos la presencia de pilina y de flagelina, los sistemas de eflujo de multidrogas, el sistema de secreción tipo III, las porinas oprD, las actividades hemolíticas y proteolíticas así como la capacidad de invasión de células epiteliales. Otros factores adicionales incluyen la capacidad de formación de biopelículas así como la presencia de elastasa, lipasa, proteasa y muchas citotoxinas. La elastasa y proteasa alcalina son conocidas porque degradan una amplia variedad de componentes tisulares tales como elementos proteicos de tejido conectivo y también se unen a los receptores de la superficie celular de los neutrófilos ²⁷.

La resistencia intrínseca y adquirida a muchos antibióticos no necesariamente relacionados estructuralmente es debida a una serie de adaptaciones, incluyendo los sistemas de eflujo activos, baja permeabilidad de la pared celular, adquisición de plásmidos, expresión de varias enzimas o por formación de biopelículas ³⁰.

En la presente tesis, se hace hincapié en dos factores de virulencia, la formación de biopelículas y la motilidad.

2.3.3.1 Formación de Biopelículas

En los ambientes naturales y clínicos, muchas bacterias son miembros de las comunidades que forman biopelículas, las cuales son ensamblajes de microorganismos adheridos a una superficie sólida y rodeada de una matriz polimérica extracelular ³¹. Pueden encontrarse en cualquier implante pero también en mucosas, como en los pulmones, oído medio o mucosa gástrica ³². Las ventajas de estar dentro de una biopelícula incluyen facilidad de interacciones metabólicas debido a la proximidad física entre las células, incrementada transferencia genética de tipo horizontal y protección de la predación y estrés antimicrobiano. Sin embargo, el estilo de vida tipo biopelícula también tiene sus desventajas, como por ejemplo, las altas densidades pueden resultar en gradientes dinámicas de nutrientes y productos tóxicos por el metabolismo ³¹.

Dentro de una biopelícula, la densidad celular es substancialmente más alta que en un cultivo plactónico, como consecuencia, muchas células de la biopelícula parecen encontrar limitaciones de nutrientes y oxígeno así como niveles altos de productos de

desecho, metabolitos secundarios y factores secretados. Es por esto, que no debe sorprender que la expresión genética sea muy diferente de sus contrapartes. Antes de formar las biopelículas, las bacterias tienen que sincronizar su expresión genética en un proceso llamado “quórum sensing” (QS), y lo hacen secretando moléculas señalizadoras extracelulares pequeñas que actúan como autoinductores para iniciar la formación y además, en menor grado, para mantenerlas ³². En *Pseudomonas* este proceso es mediado por N-acil homoserina lactona, que usualmente en cultivos plactónicos coordina el comportamiento bacteriano dependiendo de la densidad celular pero que, además, se ha demostrado que es importante en la formación de biopelículas ¹⁷.

Parece ser que esta bacteria es capaz de formar biopelículas en superficies como una estrategia de supervivencia, por ello es importante su establecimiento en diferentes tejidos del hospedero, como en los alveolos pulmonares de pacientes con fibrosis quística (FQ) ⁸. La formación de biopelículas parece estar mediada en parte por dos lectinas, LecA que es específica de galactosa y LecB específica de fucosa ³³.

En las infecciones por biopelículas, inicialmente, el tratamiento con antibióticos parece eliminar la infección, hasta que se alcanza un punto donde el tratamiento ya no es capaz de aliviar más los síntomas de la enfermedad; y esto parece darse porque, sólo las bacterias plactónicas liberadas de las biopelículas son las que mueren y temporalmente se reducen los síntomas, pero la estructura permanece intacta y es capaz de persistir ³⁴. Las infecciones causadas por bacterias que forman biopelículas, son muy difíciles de tratar debido a la alta resistencia de éstas a la acción de antibióticos ¹⁷.

Las bacterias que crecen dentro de la biopelícula están rodeadas en una matriz polimérica producida por ellas mismas. Las cepas clínicas aisladas de *P. aeruginosa* muestran un fenotipo mucoide causado por una sobreproducción del exopolisacárido alginato ³⁵, así como de otros dos exopolisacáridos Psl y Pel ³⁶. Además de estos polisacáridos, el ADN extracelular es un componente importante en la matriz de las biopelículas formadas inicialmente por esta bacteria, permitiendo mantener a las células juntas, pero a medida que madura, otras sustancias reemplazan al ADN como factor cohesivo primario ³⁷.

Antes de formar biopelículas, la bacteria usa sus apéndices de motilidad para moverse hacia las superficies cercanas: su único flagelo polar que actúa como propulsor helicoidal y sus múltiples pili tipo 4 que actúan linealmente ²¹. Usando microscopía, análisis genético y análisis electroforético 2D se ha sugerido que el desarrollo de la biopelícula por *P. aeruginosa* ocurre en cinco pasos específicos (Figura 1):

- A. Adhesión reversible, facilitada por la movilidad flagelar.
- B. Adhesión irreversible, que ocurre después de la adhesión inicial a la superficie, y donde las células de *P. aeruginosa* se mueven a lo largo de la superficie mediante el T4P y proliferan en pequeñas microcolonias. El estado de adhesión irreversible es caracterizado por el desarrollo de conglomerados celulares ⁸, los que pueden estar comprendidos por aproximadamente 30 a 100 células y que se forman como consecuencia de la división celular ³⁸.
- C. Primera maduración, en la que la formación de las microcolonias es seguida, al menos bajo ciertas condiciones, por la aparición de macrocolonias las cuales pueden ser tan altas como 100 μm o más ³⁸.
- D. Segunda maduración, en el que el grosor de los conglomerados celulares aumenta y alcanza un máximo desarrollo ⁸, las macrocolonias están separadas por canales llenos de fluidos y rodeados de una matriz compuesta de polisacárido necesaria para estabilizar la estructura tridimensional, ADN y proteínas ^{38,39} y
- E. Dispersión, finalmente durante este estado, la bacteria activa sale de los conglomerados celulares, posiblemente a través de la movilidad mediada por flagelo ⁸. La dispersión está bajo la influencia de factores ambientales tal como la disponibilidad de nutrientes orgánicos, hierro y oxígeno; y puede involucrar la regulación diferencial de la adhesividad de la bacteria, potencialmente a través de la activación de fagos líticos o a través de la señalización de GMP-di-cíclico en un evento mediado por la fosforilación proteica ⁴⁰.

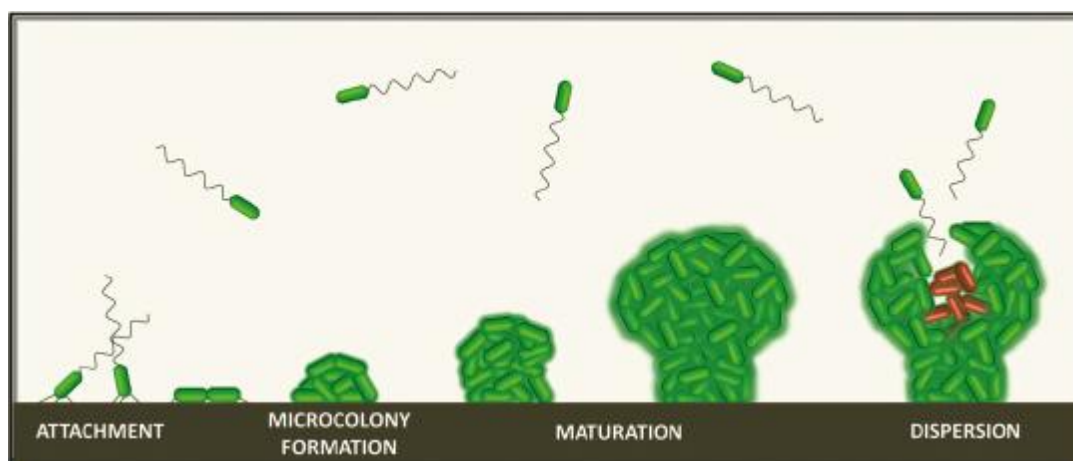


Fig. 1. Ciclo de vida de una biopelícula de *P. aeruginosa* ⁴¹.

Algunos mutantes defectuosos de *P. aeruginosa* se caracterizaron en distintos estados de la formación de las biopelículas, identificándose algunos componentes que participaron en la formación inicial, progresión de las microcolonias y maduración. A través del análisis de los fenotipos de diferentes mutantes, se halló que el T4P y el flagelo, dos organelos de movilidad, juegan un rol importante durante la interacción inicial de la pared celular con la superficie por el contraataque de las fuerzas repulsivas. Además, se encontró que el T4P se requiere para la diferenciación inicial promoviendo la agregación celular y la formación de microcolonias. También se halló que intervienen adhesinas relacionadas, las cuales parecen contribuir brindando capacidad de adaptación para colonizar totalmente diferentes tipos de superficies ⁴².

La diferenciación o maduración de las biopelículas de *P. aeruginosa in vitro* dependen de los sistemas de señalización intercelular QS. Las sintetetasas LasI y RhII sintetizan dos homoserin-lactonas, N-3-oxododecanoil homoserin lactona y N-butilil-homoserin lactona, las cuales se unen y modulan la actividad de los reguladores transcripcionales LasR y RhIR, respectivamente. Estos reguladores transcripcionales luego regulan la transcripción de muchos genes cuyos productos, incluyendo proteasas, elastasas, toxinas y hemolisinas, se cree que son cruciales para la virulencia ⁴³.

Se ha mencionado que *P. aeruginosa* es un organismo modelo para el estudio de las comunidades que forman biopelículas. Algunos reportes indican que los diferentes tipos de presiones ambientales seleccionan las variantes de la morfología de las colonias y muchas de éstas tienen fenotipos relacionados a las biopelículas³¹, tal es que parece que el desarrollo de la biopelícula varía bajo diferentes condiciones de nutrición y ambiente. Así, el desarrollo estructural de la biopelícula de *P. aeruginosa* depende de las fuentes de carbono y se puede apreciar que cuando el citrato es usado como fuente de carbono, la bacteria forma biopelículas por pisos que difieren claramente de las formadas cuando se tiene como fuente de carbono la glucosa, las cuales crecen como estructuras multicelulares en forma de hongos separadas por canales llenos de agua. Se ha sugerido que éstas últimas estructuras son formadas en un proceso secuencial que involucra subpoblaciones bacterianas sin motilidad que forman el tallo del “hongo” y una subpoblación bacteriana que migra y trepa, llevada a cabo por el T4P y que se van agregando en la parte superior³⁹.

Métodos para estudiar Biopelículas

Un gran número de métodos han sido desarrollados para el cultivo y cuantificación de biopelículas, pero no se dispone de un método o protocolo estandarizado. Es muy difícil si no imposible de comparar los resultados obtenidos con las biopelículas aún de las mismas especies cultivadas y ensayadas dentro de una vasta diferencia de condiciones. Hay métodos que utilizan modelos estáticos y dinámicos, basados en tratar de inducir la formación de biopelículas *in vitro*. Los dinámicos incluyen un reactor diseñado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC, de sus siglas en inglés), también se han diseñado el equipo de Robbins y posteriormente el equipo de Calgary, ambos en Canadá⁴⁴.

La cuantificación de biopelículas empezó con un método basado en el cultivo en las paredes de tubos y su posterior detección mediante tinción. Luego, se usaron placas de microtitulación, y los resultados del crecimiento se medían por espectrofotometría. Actualmente, se usan una variedad de métodos tal como el test en tubo, placas, microscopía, siembra en placas con agar rojo de congo, etc.⁴⁵.

2.3.3.2 Movilidad

La motilidad está fuertemente asociada a la patogénesis de *P. aeruginosa*, pues le brinda la facilidad de colonizar diferentes ambientes, adherirse a superficies y formar biopelículas ⁴⁶. Dentro de la gran variedad de factores de virulencia/competencia, se han mencionado los tres tipos de movilidad de esta bacteria: el tipo “nado” mediado por flagelo y cuya dirección de movimiento se da por las respuestas quimiotácticas frente a estímulos químicos, una movilidad de tipo social que es el “enjambre” también mediado por el flagelo y un tipo de translocación superficial llamada “contracción” mediado por los T4P, los cuales posiblemente sean las principales adhesinas, que intervienen en la adherencia a superficies celulares eucarióticas y probablemente a superficies abióticas ¹. Pareciera ser, que además *P. aeruginosa* posee un cuarto tipo de movimiento, llamado “deslizamiento” que lo hace en ausencia de flagelo y T4P ⁴⁶.

Los estudios recientes demuestran que los diferentes mecanismos para movilizarse se aplican en diferentes ambientes, como se puede apreciar en la Figura 2, y por ello, tienen un impacto directo y relacionado a la virulencia. Para ello, *Pseudomonas aeruginosa* usa los organelos superficiales, así el flagelo polar único, le permite “nadar” en hábitats acuosos y en la presencia de bajas concentraciones de agar (0,3 % p/v), también le facilita el movimiento tipo “enjambre” en agar semi-sólido (0,5 a 0,7 % p/v) y el de “contracción” a lo largo de superficies un poco más duras podría estar mediado principalmente por el T4P ⁴⁶.

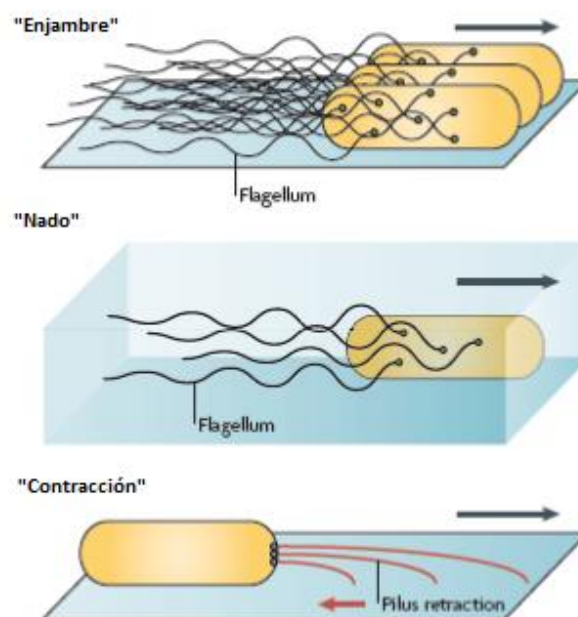


Figura 2. Movimiento bacteriano por diferentes mecanismos. El tipo “enjambre” es un movimiento multicelular de la bacteria a lo largo de una superficie y se da por rotación en hélice del flagelo. El tipo “nado” es el movimiento de bacterias individuales en líquidos, llevada a cabo por rotación del flagelo. El de “contracción” es un movimiento superficial de la bacteria que se da por la extensión del pili, cuando ellas se adhieren a una superficie y luego se retraen, empujando a la célula más cerca al sitio de adherencia ⁴⁷.

Las dos organelas de la superficie bacteriana, el flagelo y el T4P, afectan la virulencia en los modelos de enfermedad crónica y aguda por *Pseudomonas*.

2.3.3.2.1 Flagelo

P. aeruginosa posee un flagelo monotrico. El flagelo bacteriano, una estructura filamentosa que se proyecta de la membrana celular, es una organela bacteriana compleja que consiste de tres sub-ensamblajes: (i) un cuerpo basal embebido en la superficie celular, (ii) un filamento y (iii) un gancho el cual conecta el filamento al cuerpo basal ²³. El flagelo no sólo facilita a la bacteria a que se movilice y responda a los signos ambientales (quimiotaxis) sino que le facilita la adquisición de nutrientes ²³.

La motilidad flagelar ocurre a través de un motor complejo que provee energía para el torque rotacional de un filamento helicoidal de repetidas subunidades de flagelina que actúa como un propulsor. El rotor, un complejo multimérico compuesto de FliG, FliM y FliN, actúa como iniciador molecular y determina la rotación en sentido o contrasentido a las agujas del reloj. En *P. aeruginosa*, el complejo estático provee un alojamiento estacionario para el rotor y está compuesto de al menos cuatro proteínas de membrana integrales, MotAB y MotCD. La delección de las cuatro puede permitir el ensamblaje flagelar, pero la estructura no puede rotar⁴⁸.

Las bacterias que carecen de flagelo causaron menos inflamación y muerte que sus contrapartes salvajes en un modelo murino de neumonía aguda, posiblemente por la habilidad de la flagelina para desencadenar en el hospedero respuestas pro-inflamatorias vía receptor Toll tipo 5, más que una pérdida de movilidad *per se*⁴⁹.

Los flagelos se requieren para la formación de biopelículas robustas y parecen contribuir a una colonización persistente²⁰. *P. aeruginosa* usa el flagelo y los T4P para la motilidad tipo “enjambre” a lo largo de superficies semisólidas (0.5-0.7%) cuando las fuentes de nitrógeno y carbono están disponibles. El rol del T4P en el tipo “enjambre” puede depender de la cepa, así, algunos aislados los requieren para este tipo de movimiento mientras que otros que carecen de ellos pueden tener el mismo tipo de movimiento con una morfología alterada⁵⁰.

El rol de la movilidad tipo “enjambre” durante la infección *in vivo* o la colonización aún no han sido bien establecidas. Sin embargo, hay transposones insertos que atenúan la virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo de infección pulmonar crónica en rata demostrando que hay genes que se requieren. Existen varias señales necesarias para esta motilidad *in vitro*, como los llamados ramnolípidos y altos niveles de glutamato, que están presentes en el esputo de pacientes con fibrosis quística (FQ)²⁰. También, otras investigaciones muestran que hay genes que codifican factores de virulencia, como los componentes del sistema de secreción tipo III y proteasas extracelulares, que son transcritos en niveles elevados por el “enjambre” bacteriano⁵⁰.

Como parte del proceso de colonización, la bacteria sufre una serie de cambios genéticos que contribuyen con su habilidad de sobrevivir en hospederos mamíferos y que evaden la detección y la eliminación por el sistema inmunológico. Uno de esos

cambios que ha sido fenotípicamente caracterizado para esta bacteria es la pérdida de la motilidad flagelar. La pérdida de la expresión génica flagelar y la función de motilidad está asociada con el incremento de las cargas bacterianas y la elevada severidad de las enfermedades en pacientes con FQ. La disminución de la regulación de la expresión flagelar parece que confiere una ventaja de supervivencia a *P. aeruginosa* una vez que coloniza al hospedero por evasión de receptores fagocíticos y de la señalización inflamatoria dirigida por el TLR5 ⁴⁸.

Se ha reportado que la fagocitosis no opsónica de *P. aeruginosa* por los macrófagos murinos y humanos, requiere la expresión del flagelo, y concluyen que éste es un ligando necesario para desencadenar la internalización fagocítica de la bacteria. Además, la expresión flagelar se reporta como crítica para inducir la inflamación durante la infección, y la pérdida de la expresión génica flagelar conduce a respuestas inflamatorias ineficientes y un control bacteriano atenuado. Amiel et al. demostraron que las cepas de *P. aeruginosa* que carecen de la motilidad tipo “nado” son resistentes a la fagocitosis *in vitro* e *in vivo*. Dichos resultados, muestran que es la pérdida funcional de tal motilidad mediada por flagelo y no la pérdida del aparato flagelar como un ligando para la asociación o activación, la que confiere resistencia, y que este fenotipo tiene un rol importante en la evasión inmune por esta bacteria en células de humanos y ratones ⁴⁸.

Estudio de las Movilidades por Flagelo

Estos métodos están basados en el movimiento en ambientes acuosos o a lo largo de superficies usando diversos modos de translocación. El “nado” en una superficie toma lugar cuando la película del fluido es lo suficientemente gruesa y el patrón micromorfológico está desorganizado. Cuando la capa de fluido en una superficie es relativamente delgada, la bacteria que nada llega a elongarse y el flagelo se alarga moviéndose de una manera coordinada conocida como “enjambre” ⁵¹.

En los estudios de quimiotaxis en bacterias, entre otros métodos, se usaron placas con agar semisólido para examinar la influencia de diferentes sustancias químicas en la movilidad flagelar de bacterias. En una concentración de agar al 0.2% la bacteria “nada” en la superficie del agar pero, si las vías metabólicas oxidativas no se

prefieren, nadan también a través de la profundidad del agar o en la base. Algunos autores usan “enjambre” como sinónimo considerando que las bacterias “nadan” en medios fluidos y se mueven tipo “enjambre” bajo condiciones apropiadas ⁵¹.

Una estrategia que usan algunas bacterias, es adaptarse rápidamente y sobrevivir cuando hay cambios en las condiciones ambientales y formar una población diversa fenotípicamente por un mecanismo llamado fase de variación. En las bacterias gram negativas, la expresión de un número de estructuras celulares superficiales y proteínas de la membrana externa, especialmente aquellas ligadas a la adhesión, agregación y morfología colonial, se sabe que se regulan por mecanismos de fase variables. En *Pseudomonas aeruginosa* se han reportado las variantes, que presentan colonias grandes (L) y las colonias pequeñas que presentan abundantes fimbrias polares y pili, las cuales muestran motilidades de tipo flagelar (quimiotáctica) y de “contracción” reducidas, y rápida iniciación de la formación de biopelículas fuertemente adheridas ¹.

2.3.3.2.2 Pili Tipo IV

Los pili (derivado del latín) son grandes estructuras proteináceas, observadas por primera vez en los gram negativos por los años 1950s, mediante microscopía electrónica. En las bacterias gram negativas, han sido caracterizados con detalle cinco tipos de pili basados en sus vías biosintéticas: i) Tipo I y tipo P de *Escherichia coli* (vía chaperona/guía); ii) tipo III de *Yersinia*, *Shigella* y *Salmonella* (aguja de secreción); iii) el pili tipo IV de *Neisseria*; iv) el tipo “rizo” de *E. coli* y *Salmonella* y el v) el pili de secreción tipo IV. Estos pili han sido implicados en muchas funciones tales como adhesión a las células hospederas, formación de biopelículas, captación del ADN, evasión inmune, etc. ^{52, 53}.

P. aeruginosa también es capaz de realizar un tipo de motilidad independiente de flagelo llamada “contracción” en el cual está implicado el pili tipo IV (T4P) ⁴⁸. Este tipo de movimiento es el único a lo largo de superficies semisólidas y sólidas y es el que permite a la bacteria moverse en superficies bióticas y abióticas ⁴¹. El T4P es una de las más amplias estructuras de la superficie celular y tiene funciones esenciales en la patogénesis causadas por muchos patógenos de humanos mediado

por la adhesión a las células hospederas, la formación de microcolonias, motilidad celular, intervención en la adherencia a células epiteliales, contribución a la formación del biopelículas y es requerida para una virulencia total en modelos de infección corneal y transformación natural. El T4P es altamente dinámico y la motilidad mediada por él se da bajo ciclos de extensión y retracción, éstas oscilaciones están relacionadas con una diversidad de sus funciones ^{20, 54}.

Se caracterizó un fago lítico de *Pseudomonas aeruginosa* llamado PA1 Ø que tiene un amplio espectro bactericida abarcando varias especies de bacterias gram positivas y gram negativas, pudiendo erradicar las células dentro de una biopelícula, por lo que podría usarse como un agente antimicrobiano alternativo en infecciones relacionadas a biopelículas. Se sabe también que este fago requiere del T4P para la infección ²².

Formación

El T4P está formado por filamentos delgados (5-8 nm. de diámetro), muchas micras de largo y típicamente sólo está compuesto de la subunidad pilina codificada por el gen PilA ^{54, 55}, pero a pesar de ello son fibras muy fuertes involucradas en un gran número de procesos, desde la adherencia a superficies hasta la transferencia de electrones

Los sistemas T4P comparten un set central de 10 proteínas y la bioinformática, así como los datos genéticos y bioquímicos que sugieren que las proteínas T4P forman un complejo proteico que abarca desde el citoplasma, membrana interna, periplasma y membrana externa. Parece ser que el pili se ensambla en la membrana interna a partir de un pool de pilina madura que está insertada en dicha membrana a través de la parte hidrofóbica N-terminal de la α 1-hélice. La ATPasa citosólica PilB parece que es reclutada a la base del pili a través una proteína anclada en la membrana interna ⁵³.

Un gran número de genes están implicados en el ensamblaje y dinámica de T4P, y son los que codifican la subunidad mayor de pilina, PilA, y un grupo de proteínas menores tipo pilina; la N-metiltransferasa/peptidasa, PilD, esencial para el procesamiento de prepilinas en su forma madura; un complejo de ensamblaje en la membrana interna compuesta de PilM/N/O/P; un poro tipo secretina en la membrana

externa, PilQ oligomerizado con la asistencia de la lipoproteína PilF; y el motor de ATPasas PilB y PilT/U ⁵⁶. La subunidad PilA es exportada fuera de la célula y polimerizada para formar la cadena superficial. El ensamblaje requiere la unión y metilación de un péptido líder hidrofílico mediado por una peptidasa prepilina tipo IV durante la secreción de pilina. Una característica notable de la biogénesis del T4P es su similitud con el sistema de secreción tipo II, particularmente los productos génicos pseudopili o tipo prepilina compartidos por las dos vías en *P. aeruginosa*. Los genes para prepilina están localizados en uno de los “clusters” genéticos de T4P y parecen jugar un rol importante en su ensamblaje, exportación, localización, maduración y la eficiencia general de la maquinaria T4P ⁵⁷. El PilQ forma una estructura dodecamérica de aproximadamente 1 MDa que forma un poro en la membrana externa que permite que el pili cruce la membrana externa ⁵³.

La extensión de T4P involucra la incorporación de la subunidad pilina a la base del pili a partir de un reservorio en la membrana interna, y la retracción involucra la remoción y transferencia de subunidades de pilina de un pili base hacia la membrana interna ⁵⁴. Muchos sistemas de T4P también poseen una ATPasa de “retracción” lleva a cabo la despolimerización del filamento del pili.

Un modelo de ensamblaje para T4P se puede apreciar en la Figura 3.

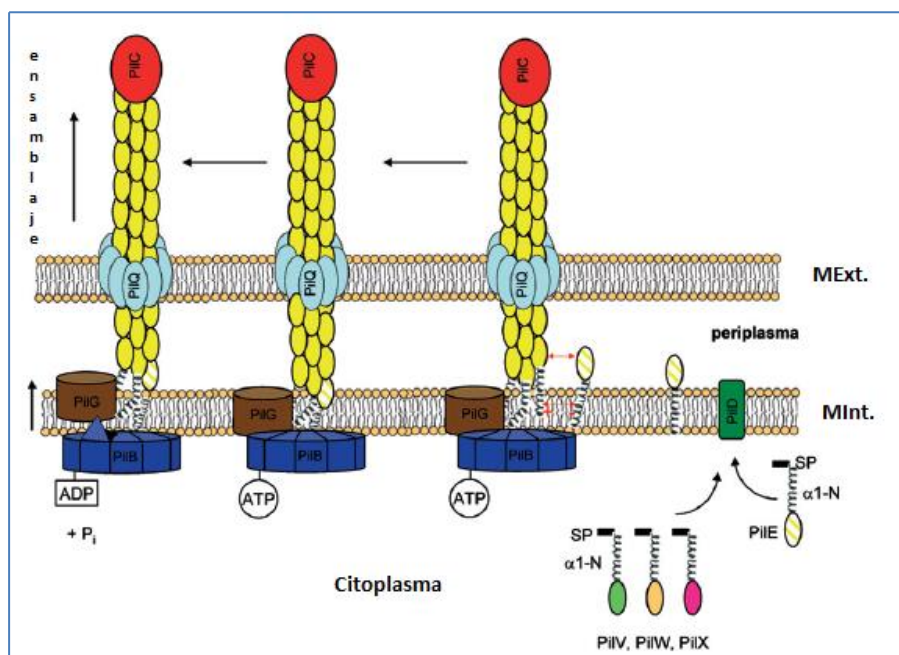


Figura 3. Ensamblaje del pili de *Neisseria* como ejemplo del T4P. Las subunidades de pilina (PilA, en amarillo) son secretadas a través de la membrana interna (MInt.) al periplasma y el péptido señal (SP) es anclado por la prepilina peptidasa PilD (verde). La carga negativa de la cadena lateral de ácido glutámico en la región $\alpha 1$ -N atrae al N-terminal cargado positivamente de la subunidad PilA terminal en el filamento en crecimiento. Las interacciones adicionales entre los dominios de PilA globular facilitan a la subunidad llenar la brecha existente en la base del pili. La ATPasa de ensamble (Pil B, en azul) está asociada con la parte citoplásmica de la proteína de la membrana interna PilG (marrón), sufriendo cambios conformacionales durante la hidrólisis de ATP y empuja al filamento del pili fuera de la membrana, dejando una brecha para la siguiente subunidad de PilA. Varias pilinas menores también contienen la región $\alpha 1$ -N y pueden ser agregadas a la estructura del pili. Adicionalmente, para el ensamble de la ATPasa PilB, el aparato piliar también contiene una ATPasa de retracción relacionada estructuralmente (PilT) que puede remover las subunidades de pilina en la base del pili resultando en la motilidad “twitching”⁵⁸.

Los nombres de los componentes de ensamblaje del pili difieren dependiendo del microorganismo como se muestra en la siguiente Tabla 1 ¹⁹.

Tabla 1. Nomenclatura de los componentes clave en la biogénesis del pili Tipo IV

Bacteria	Subunidad pilina	Peptidasa prepilina	ATPasa de ensamblaje	ATPasa de retracción	Proteína de membrana interna	Secretina	Proteínas secretadas
Pili T4a							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PilA, PilE	PilD	PilB	PilT, PilU	PilC	PilQ	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PilE	PilD	PilF	PilT	PilG	PilQ	
<i>Neisseria meningitidis</i>	PilE	PilD	PilF	PilT	PilG	PilQ	
<i>Francisella tularensis</i>	PilE	PilD	PilF	PilT	PilG	PilQ	PepO, Bglx
<i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable	PilA	PilD	PilB		PilC	ComE	
<i>Mycococcus xanthus</i>	PilA	PilD		PilT		PilQ	
<i>Clostridium perfringes</i>	PilA1, PilA2	PilD	PilB	PilT			
<i>Dichelobacter nodosus</i>	FimA	FimP	FimN	PilT	FimO	PilQ	Varias proteasas
Pili T4b							
<i>Vibrio cholerae</i>	TcpA, MshA	TcpJ	TcpT	BfpF	TcpE	TcpC	TcpF
<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	BfpA	BfpP	BfpD		BfpE	BfpB	
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	CofA, LngA	CofP, LngP	CofH, LngH		CofI	CofD, LngD	CofJ
<i>Salmonella typhi</i>	PilS	PilU			PilR		

Fuente: Craig L, Li J. 2008¹⁹.

El ensamblaje del T4P, como se ha mencionado, involucra 12 o más proteínas y pueden estar, en muchos casos, codificadas por el mismo operón. Existen varios componentes esenciales que son utilizados por los sistemas T4P y que también se encuentran en algunos sistemas de secreción tipo II y sistemas flagelares de arqueas. Estos son, la subunidad de pilina, la prepilina peptidasa de la membrana interna que une el péptido líder N-terminal; la ATPasa de ensamblaje que favorece dicho proceso en el pili; la proteína integral de la membrana interna que capta la ATPasa del citoplasma; y una secretina de membrana externa ¹⁹.

La Subunidad Pilina

Las pilinas tipo IV son producidas por muchas bacterias gram negativas de evolución divergente, sin embargo, éstas proteínas han sido agrupadas en la misma clase porque comparten secuencias características comunes y la modificación post-translacional se da de la misma manera. Además, todas ellas son producidas como precursoras, que poseen una secuencia líder N-terminal básica. Luego la eliminación del péptido señal y la N-metilación son llevadas a cabo por una endopeptidasa bi-funcional que fue identificada por primera vez en *P. aeruginosa* (PilD), la cual actúa entre un residuo invariante de glicina y fenilalanina (o raramente metionina) ⁵³.

Las pilinas tipo IV son clasificadas en base a ciertas características: el segmento N-terminal hidrofóbico (aprox. 25-30 residuos), un residuo N-metilado N-terminal y un par de cisteínas en la región C-terminal. Por ello, se clasifican en dos grandes grupos, tipo IVa y tipo IVb que difieren por el largo del péptido señal (Tabla 2). El pili tipo IVa tiene un péptido corto (5-6 aminoácidos), mientras que el tipo IVb contiene uno más largo (15-30 aminoácidos) ⁵³. También se sabe que las tipo IVa se presentan en una variedad de bacterias con amplia gama de hospederos, mientras que las pilinas tipo IVb se encuentran casi exclusivamente en patógenos entéricos ¹⁹. Los pili de *P. aeruginosa* son miembros de la familia tipo IVa ⁵⁹.

Tabla 2. Comparación de las pilinas tipo IVa y IVb en bacterias gram negativas

Característica	Pilinas Tipo IVa	Pilinas Tipo IVb
Bacteria	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PilE <i>Neisseria meningitidis</i> PilE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PilA <i>Mycobacterium bovis</i> , pilina <i>Moraxella lacunata</i> proteína fimbrial Q <i>Myxococcus xanthus</i> PilA	<i>Vibrio cholerae</i> TcpA <i>E. coli</i> enteropatógena BfpA <i>E.coli</i> enterotoxigénica LngA <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi PilS <i>Citrobacter rodentium</i> CfcA
Largo del péptido principal	5-6 aminoácidos	15-30 aminoácidos
Largo promedio de la proteína madura	150 aminoácidos	190 aminoácidos
Residuo N-terminal N-metilado	Fenilalanina	Metionina, leucina o valina
Largo promedio de la región-D	22 aminoácidos	55 aminoácidos

Fuente: Craig L, Li J. 2008 ¹⁹.

Sin embargo, en ambos subgrupos las pilinas de muchos organismos diferentes comparten el mismo diseño modular que les permite ensamblarse en filamentos de pili usando el mismo plano arquitectónico, pero la topología de su pliegue- β difiere, resultando en diferentes pliegues proteicos. A pesar de las topologías diferentes, la estructura conservada del esqueleto sostiene a las subunidades juntas en el filamento y el bucle- $\alpha\beta$ y las regiones-D definen la forma superficial y la química (Figura 4), y por tanto las funciones del pili ¹⁹.

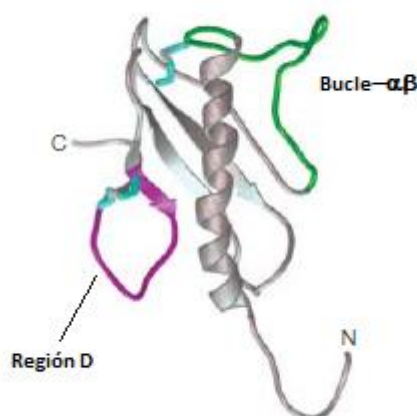


Figura 4. Estructura de la T4P de *Pseudomonas aeruginosa*.

Este proceso de ensamblaje asegura que el dominio de unión al receptor esté localizado solamente en la punta del pili y reconozca específicamente las fracciones GalNAc- β -D-(1,4)-Gal de asial-GM1 como receptor ⁶⁰.

El Filamento de Pili

El filamento se mantiene unido por extensas interacciones hidrofóbicas entre las α -hélices N-terminales en el núcleo del filamento. Los dominios globulares, se empaquetan más libremente en la superficie del filamento, contactándose cada uno sólo en lo profundo del filamento. Este empaque da como resultado una superficie del filamento muy corrugada, con ranuras que recorren los dominios globulares. Algunas de estas ranuras están llenas de residuos de cargas positivas, las cuales podrían explicar el rol del pili en la captación del ADN, el cual podría unirse a estas

ranuras de forma no específica a través de su esqueleto cargado negativamente y ser introducido dentro de la célula por la retracción del pili ¹⁹.

Además, las pilinas de *P. aeruginosa* truncadas en la porción N-terminal forman “nanotubos” helicoidales, cuando se colocan en solventes no polares. Estos filamentos se asemejan a los pili nativos cuando se examinan por microscopía electrónica y tienen alta capacidad de unión al ADN. Aún se investiga si las interacciones que mantienen a los nanotubos juntos también juegan un rol importante en la estabilidad del pili de esta bacteria ¹⁹.

Mecanismo de Movimiento

La regulación de las oscilaciones de extensión/retracción de T4P se centra en dos motores proteicos, PilB y PilT, los cuales son miembros de la superfamilia de secreción de ATPasas. Estas son proteínas hexaméricas, dinámicas, las cuales convierten la energía de la hidrólisis del ATP para la translocación de proteínas y/o ADN sobre las membranas. Con la excepción del PilT, en las cepas salvajes, T4P requiere todas las proteínas T4P para su extensión. Por el contrario, PilT es la única proteína requerida para la retracción de T4P. Las evidencias genéticas y bioquímicas sugieren que PilB y PilT funcionan de manera antagonista y que la energía para el trabajo mecánico de extensión del T4P es provista por la hidrólisis del ATP de PilB, y la energía para la retracción es obtenida de la hidrólisis del ATP por el motor de retracción de T4P, es decir PilT ⁵⁴.

La motilidad celular dependiente de T4P, es conocida como motilidad tipo “contracción” que en *P. aeruginosa*, ocurre cuando las células se localizan en una superficie e incluye tres pasos:

- A. La extensión de T4P
- B. La adhesión a la superficie, y
- C. La retracción.

Mientras que la extensión desde la superficie celular no genera fuerza suficiente para mover una célula, una fuerza excedente de 100 pN por T4P se genera durante las retracciones, y esta fuerza es suficientemente grande para jalar una célula bacteriana hacia delante. Cada T4P individual se retrae independientemente ⁵⁴. Es decir, la

bacteria puede polimerizar y despolimerizar el T4P a través de la pared celular, dando a este T4P, la única habilidad, entre todos los apéndices filamentosos de ser dinámicamente extendido y retraído. El T4P se retrae en rangos de aproximadamente 0.5 $\mu\text{m/s}$ para *P. aeruginosa* ²¹. Para “arrastrarse” en toda su longitud a lo largo de una superficie, las bacterias orientadas horizontalmente (paralelas al plano de la superficie) retraen el T4P adhiriéndose a la superficie, luego van jalando el cuerpo celular hacia delante. Sorpresivamente, el promedio de la velocidad al cual *P. aeruginosa* se arrastra (aprox. 0.3 $\mu\text{m/s}$) es menor que la velocidad al cual el T4P se retrae (aprox. 0.5 $\mu\text{m/s}$). Las interacciones entre los múltiples T4P además generan distintas características en las trayectorias de arrastre de ésta bacteria ²¹.

La extensión y retracción del filamento del pili está relacionado con varias funciones que incluyen la motilidad tipo “contracción”, interacciones célula-célula, competencia natural, formación de biopelículas e infección por un bacteriófago específico del pili ⁶¹.

Estudio de la expansión de la colonia debido a la Movilidad tipo “contracción”

En los recientes estudios microscópicos de la movilidad tipo “contracción” se examinaron los movimientos celulares en los bordes externos de las colonias que crecen en las superficies de agar secas pero en condiciones de humedad. Bajo estas condiciones la movilidad observada fue relativamente lenta, con un modo desorganizado de translocación en el cual las células se mueven predominantemente de manera individual siguiendo un movimiento intermitente y desigual. El estudio microscópico de expansión de la colonia mediada por este tipo de movilidad ha sido grandemente facilitado en años recientes explotando la observación de que la expansión rápida de la colonia ocurre en la superficie intersticial entre un cubreobjeto y una fina capa de medio nutritivo solidificado ⁶².

La característica más llamativa de la expansión de la colonia con movimiento de “contracción” que ocurre en este sistema es la red intrincada de células que se forman detrás de los bordes salientes. Está claro que bajo éstas condiciones dicha movilidad se manifiesta como un mecanismo multicelular altamente organizado y

rápido de la expansión de la colonia presumiblemente para facilitar una colonización rápida de grandes áreas ⁶².

Genotipos de *pilA*

El gen *PilA* que codifica para la pilina de esta bacteria, se encuentra en un locus conservado dentro del cromosoma, entre el gen *PilB* divergentemente transcrito y el gen *ARNt* ⁵⁵. Se ha demostrado que las cepas de *P.aeruginosa* expresan uno de los cinco alelos de *PilA* filogenéticamente distintos. Las pilinas difieren en varios aspectos tal como sus secuencias y el largo total; el tamaño del bucle C-terminal unido a un puente disulfuro que es crítico para el ensamblaje y la asociación del gen de la pilina con genes accesorios específicos continuos en cassetes genéticos; por lo que, basados en estos criterios, las pilinas fueron clasificadas en cinco grupos: I-V. Las proteínas accesorias de la pilina actúan en la modificación post-translacional o en la modulación del ensamblaje del pili ⁶³.

Como se ha mencionado, las pilinas de *Pseudomonas aeruginosa* pueden dividirse en cinco grupos filogenéticos, designados del I al V, basado en la secuencia de aminoácidos y la presencia de genes accesorios únicos inmediatamente continuos a *pilA*. Sólo las pilinas de los grupos I y IV se pueden glicosilar (Fig 5) ⁶⁴.

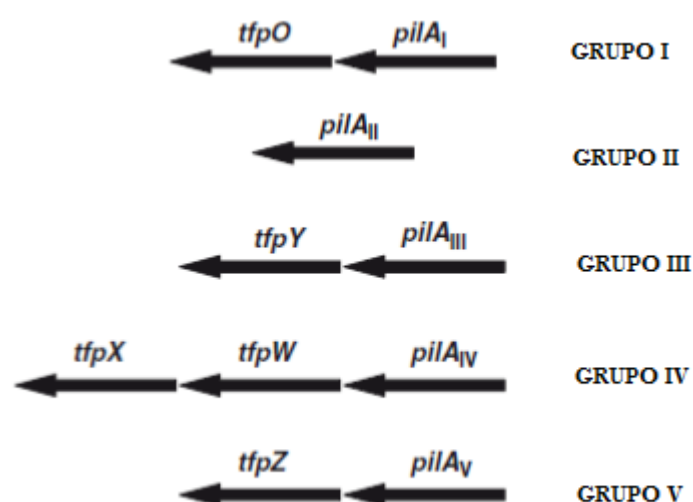


Figura 5. *PilA* y gen(es) accesorio(s) asociado(s) en *P. aeruginosa*. Los genes que se indican en todos los grupos son flanqueados por las secuencias conservadas de *ARNt*-Thr y *PilB* ⁶⁴.

Los análisis filogenéticos demostraron que las pilinas de los grupos I y II estaban más cercanamente relacionadas una a la otra, que a las pilinas de los grupos III, IV o V. De los cinco alelos, todos excepto uno (grupo II) están vinculados con uno o dos genes accesorios característicos, localizados cerca al gen de la pilina ⁵⁵.

Las pilinas del grupo I, están asociadas con el gen accesorio tfpO (pilO), que codifica una glicosiltransferasa que modifica postranslacionalmente cada subunidad de pilina en el residuo conservado del residuo de Ser C-terminal con una unidad de antígeno O antes del ensamblaje en el pili. Esta modificación influye en las propiedades físicas del pili y en sus funciones, tal es así que los mutantes de tfpO fueron menos virulentos que las cepas salvajes en ensayos de infección con animales de experimentación ⁵⁵. La inactivación del tfpO previene la glicosilación de la pilina pero no bloquea la expresión del pili en la superficie o de la motilidad tipo “contracción” ⁶⁵.

Las pilinas del grupo IV que se asocian a los genes accesorios tfpW y tfpX también son glicosiladas postranslacionalmente en los residuos de Ser y Thr. Sin embargo, el glicano es un homopolímero de D-arabinofuranosa, que es un azúcar poco común en procariotas. Al igual que TfpO, el producto del gen tfpW parece ser que es una proteína de la membrana interna con múltiples dominios y una fracción glicosiltransferasa ⁵⁵. La pérdida de glicosilación disminuye marcadamente la cantidad de pili expresada en la superficie en un mutante tfpW, lo que sugiere que este proceso puede ser necesario para el ensamblaje normal del pili ⁶⁵. Las pilinas de los grupos III y V y codificados por los genes tfpY y tfpZ respectivamente, no se glicosilan y no están asociadas ni con el gen tfpO o tfpW, dichos genes, así como el gen accesorio del grupo IV, gen tfpX, parece ser que codifican proteínas de la membrana interna con aproximadamente 50% de similitud en las secuencia de aminoácidos y en los dominios transmembranales N-terminales ⁵⁵.

Reacción en cadena de la Polimerasa

El descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1985 revolucionó el diagnóstico de las enfermedades infecciosas en los laboratorios clínicos porque permitió una detección e identificación de patógenos rápida, sensible y específica directamente de las muestras clínicas, sin la necesidad de cultivos ⁶⁶.

Un mix de reacción para PCR convencional consiste del ADN blanco, dos cebadores, ADN polimerasa estable al calor, deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs, que incluyen dATP, dCTP, dGTP y dTTP), y un “buffer” que usualmente contiene Magnesio divalente. Los cebadores son oligonucleótidos cortos (20-30 pares de bases) de secuencia conocida que son complementarias a los dos extremos 3’ del ADN blanco. La especificidad de los cebadores determina la exactitud del ensayo de PCR. La amplificación por PCR es automática y llevada a cabo en termocicladores programados para calentar y enfriar a diferentes temperaturas. Cada ciclo de PCR involucra tres pasos: i) Denaturación, ii) alineamiento y iii) extensión, y los ciclos se repiten de 20-40 veces. Durante la denaturación, el ADN molde es calentado (94°-96°C) para separar las dos cadenas de ADN, luego se baja la temperatura (50°-65°C) durante el paso de alineamiento para permitir que los cebadores específicos se hibriden a los extremos 3’ de las cadenas de ADN separadas. La temperatura de alineamiento depende del largo y composición de los cebadores. Finalmente, durante la extensión (72°C), la Taq polimerasa estable al calor cataliza la elongación de los cebadores por incorporación de los dNTPs complementarios que se unen al ADN blanco. La extensión por los cebadores forma dos nuevas cadenas de ADN para el siguiente ciclo de PCR. En teoría, la cantidad de ADN blanco debe duplicarse después de cada ciclo de PCR ⁶⁶.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha llegado a ser un instrumento rutinario en los laboratorios de diagnóstico microbiológico para detectar y/o caracterizar los organismos que causan enfermedades de las muestras de pacientes. Los formatos de ensayo por PCR van desde el simple convencional hasta los de tiempo real. La PCR convencional usa tubos y la detección del producto de ADN amplificado se puede visualizar por la separación de los fragmentos de ADN en gel de agarosa o de poliacrilamida bajo la influencia de corriente eléctrica (electroforesis). La adición de un colorante tal como el bromuro de etidio, que se une al ADN, ya sea durante la electroforesis o en una inmersión después de la electroforesis, y la excitación de la unión del colorante por irradiación con la luz UV mostrará el tamaño del ADN producto del PCR. La identificación del producto de PCR se confirma por comparación con un patrón de tamaños de fragmentos de ADN de tamaño conocido. Se puede tomar una fotografía para análisis del producto y conservar los resultados ⁶⁷.

La aplicación de PCR y otros métodos de biología molecular requiere la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras biológicas y una serie de métodos que han sido desarrollados para rápidas extracciones a partir de diversas muestras. Los ácidos nucleicos han sido convencionalmente extraídos por uno o por la combinación de los siguientes métodos: extracción con fenol y fenol/cloroformo, por uso de agentes de denaturación, método de proteinasa K/fenol, métodos que usan isotiocianato de guanidina y fenol, etc.

Los ensayos de PCR convencional típicamente toman entre 4-5 horas desde que se preparan las muestras para su amplificación hasta su análisis en electroforesis. Este método es simple y relativamente costo efectivo y ha sido ampliamente utilizado por los laboratorios desde los estudios presentados en las primeras publicaciones que utilizan PCR ^{66, 67}.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Estudio

Descriptivo, longitudinal.

3.2 Lugar de Ejecución

Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.

3.3 Muestras

58 cepas provenientes de pacientes hospitalizados aislados entre abril y octubre del 2012, en tres hospitales de Lima Metropolitana (Anexo 1).

3.4 Recolección de las Muestras

Se recibieron las muestras sospechosas provenientes de pacientes hospitalizados y se procedió a analizarlas dentro de las 24 horas, las pruebas de identificación y confirmación se realizaron utilizando métodos convencionales en el Laboratorio de Microbiología.

3.5 Identificación Microbiológica

Se procedió según las especificaciones del Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias del Instituto Nacional de Salud ⁶⁸, que consistió en someter a una colonia aislada sospechosa en TSA a las siguientes pruebas:

3.5.1 Observación de la Morfología celular:

Se determinó por observación microscópica de las cepas aisladas empleando la Tinción Gram. Se observaban bacilos gram negativos rectos o ligeramente curvados que suelen disponerse generalmente en parejas ²³.

3.5.2 Crecimiento en Agar Sangre y Agar Cetrimide:

Las colonias son generalmente planas, algo extendidas, bordes aserrados, en Agar Sangre presenta b-hemólisis y en Agar Cetrimide se presenta una pigmentación verde y un olor característico semejante a uvas ²³.

3.5.3 Prueba de Oxidasa:

Se trabajó a partir del crecimiento bacteriano en TSA. Se humedece una fracción de papel de filtro con el reactivo dentro de una placa de Petri. Con la ayuda de un palillo se escoge la colonia a probar y se coloca extendiéndola sobre el papel filtro. La prueba será positiva cuando haya un viraje hacia el azul-violeta, con el reactivo N,N,N,N, tetrametil-p-fenilendiamina (Sigma) después de 10-15 segundos. En la prueba negativa no hay viraje de color ⁶⁸.

3.6 Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana

Se procedió a realizar el perfil de sensibilidad antimicrobiana de acuerdo al CLSI ⁶⁹.

3.7 Capacidad de Formación de Biopelículas

Se utilizó el Método del Tubo. En este método el TSB adicionado de glucosa se inoculó con el microorganismo de un cultivo fresco e incubado por 24 horas a 37 °C. Los tubos luego se decantaron y lavaron con PBS pH 7.3 y se secaron. Los tubos secos luego se colorearon con cristal violeta al 0.1%. El exceso de colorante se removió y los tubos se lavaron con agua desionizada. Luego se dejaron secar los tubos en posición invertida y se observó la formación de biopelículas.

Se considera que la prueba es positiva, cuando una película fina pero visible está adherida a la pared y al fondo del tubo. La formación de un anillo en la interfase no es indicativa de la formación de biopelículas ⁷⁰.

3.8 Evaluación del Tipo de Movilidad

3.8.1 EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD TIPO “NADO”

Las cepas se inocularon con asa aguja en placas conteniendo triptona (Oxoid) al 1% e incubadas por 16 horas a 25 °C. Se observa una zona circular opaca alrededor del punto de siembra, que corresponde a la migración bacteriana ⁵¹.

3.8.2 EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD TIPO “ENJAMBRE”

Las cepas se inocularon con un asa aguja en una placa conteniendo agar (Merck) al 0,5% suplementada con dextrosa (Sigma). Se incubaron a 30 °C por 24 horas ⁵¹. La colonia crece alejándose del punto de siembra.

3.8.3 EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD TIPO “CONTRACCIÓN”

Las cepas se sembraron con un asa aguja en una placa conteniendo una fina capa de agar LB (Sigma). Después de la incubación por 24 a 48 horas a 30 °C, se examinó una zona opaca de crecimiento que va desde el punto de inoculación hacia afuera en la interfase entre el agar y la placa. La habilidad bacteriana de adherirse a la superficie se analizó retirando la capa de agar, lavando, coloreando con cristal violeta por 5 minutos y volviendo a lavar para retirar el exceso de colorante ⁵¹.

3.9 Extracción de ADN

El ADN cromosomal se aisló a partir de 1 a 1,5 mL. de una suspensión de cada cepa aislada usando el procedimiento de extracción fenol/cloroformo (Merck) modificado. Las células del cultivo fueron pelleteadas por centrifugación, y lavadas dos veces con solución salina, y suspendidas en buffer TE. Se agregó SDS (Sigma) a una concentración final de 0,5 % y Proteinasa K (Sigma) hasta concentración final de 0,5 mg/mL. Se llevó a incubar a 56°C por 3 horas. Luego a ésta mezcla se le adicionó 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (Merck), se homogeneizó y centrifugó.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, y se adicionó igual volumen de alcohol absoluto (Merck) frío y acetato de sodio (Merck) 3M pH 6,0 a una concentración final de 0,3M. Se homogeneizó cada tubo y se llevó a -20 °C toda la noche. Se centrifugó y descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet por 2 veces con 800 µL de etanol (Merck) al 70 %, luego se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a 37 °C. Finalmente, se resuspendió el ADN en 100 µL de buffer TE ⁷¹.

Se comprobó la presencia mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.10 PCR para la Amplificación de la Región entre pilB y tARN-Thr

Los cebadores específicos se tomaron del trabajo realizado en el Centro para la Infección e Investigación en Biomateriales de la Universidad de Toronto, Canadá. La región amplificada es el ORF comprendido entre pilB y tARN-Thr:

5'-TCC AGC AGC ATC TTG TTG ACG AA-3'

5'-CGA ATG AGC TGC TCT ACC GAC AGA GCT-3'

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µL conteniendo 50 pmol de cada cebador, junto con 1 µL de ADN extraído, 3 µL de dNTPs (Fermentas) 10 mM, 5 µL de buffer PCR 10X (Fermentas) y 0,5 µL de Taq polimerasa (Fermentas) ⁷.

El programa de temperaturas de la PCR fue el siguiente:

Denaturación inicial, a 95 °C por 15 minutos.

Se realizaron luego 30 ciclos de PCR, de la siguiente manera:

Denaturación, 95 °C por 30 segundos

Alineamiento, 60 °C por 45 segundos

Extensión, 72 °C por 2 minutos.

Y, la extensión final, 72 °C por 7 minutos.

Luego de la amplificación, 5 µL de los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0% en TBE 1X. El marcador de peso molecular fue utilizado para determinar por comparación el peso molecular de los productos amplificados. Los productos amplificados se colorearon con Fluorescent DNA Loading Dye (GeneOn).

3.11 PCR Para la amplificación de Genes Accesorios

La reacción de PCR consistió de un volumen de 50 μL con 1 μL de ADN de cada cepa, 3 μL de dNTPs 10 mM, 50 pmol de cada cebador ⁷:

TfpO:

5'-CGT ACT ATT CTA TTA TTG CTG A-3'

5'-CAA AGG ATG GCC TAC GAA-3'

TfpO2:

5'-CTG ATG CTG TTT TCC TTC-3'

5'-GCA TCT CGC CAC AAC ACG-3'

TfpY:

5'-AAA TAG CAG GAG GAT GGC A-3'

5'-CTC CCC ACT ATC CGC TCA A-3'

TfpZ:

5'-AAT ACA CGG TGG CAG TTG G-3'

5'-AAA GCG AAG AGG ACG GGA A-3'

Todas las condiciones fueron similares al PCR anterior.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

El perfil de sensibilidad a los antibióticos por las diferentes cepas, se muestra en la siguiente Tabla 3.

TABLA 3. PERFILES DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS AISLADAS DE *P. aeruginosa*

CEPA	TZP	AZC	FEP	IPM	MEM	CN	TB	MK	CIP	LEV
1	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R
2	R	R	S	R	R	I	R	S	R	R
3	R	R	I	R	R	R	R	S	I	R
4	I	R	I	R	R	S	R	R	R	R
5	I	R	I	R	R	I	S	R	I	R
6	R	R	I	R	R	R	R	R	S	I
7	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S
8	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S
9	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10	I	R	R	R	R	R	R	R	I	S
11	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
13	R	R	I	R	R	S	I	S	R	R
14	R	R	R	R	R	S	I	S	R	S
15	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R
16	R	R	S	R	R	R	R	S	R	I
17	I	I	R	S	R	R	R	R	R	R
18	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R
19	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S
22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
23	I	S	S	S	S	R	I	S	R	I
24	S	S	S	R	R	I	I	S	S	S
25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
26	I	S	I	S	S	I	S	R	S	S
27	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
28	S	S	S	R	R	I	R	S	S	S
29	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
30	R	R	I	S	S	R	R	S	R	R
31	S	S	I	R	R	I	S	S	S	S
32	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S

CEPA	TZP	AZC	FEP	IPM	MEM	CN	TB	MK	CIP	LEV
33	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
34	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R
35	R	R	S	S	R	R	R	I	R	S
36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
37	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
38	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
40	R	R	S	S	R	R	R	I	R	R
41	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
43	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R
44	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
45	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
46	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R
47	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
48	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I
49	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
50	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I
51	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
52	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
53	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S
54	I	R	I	S	I	S	S	S	S	S
55	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S
56	I	R	S	R	I	S	S	S	S	S
57	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
58	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S

TZP: Piperacilina-Tazobactam, AZC: Ceftazidima, FEP: Cefepime

IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, CN: Gentamicina, TB: Tobramicina

MK: Amikacina, CIP: Ciprofloxacina, LEV: Levofloxacino

Los resultados del perfil de resistencia de acuerdo a la procedencia de cada cepa se muestra en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4. Distribución de resistencia antimicrobiana de los aislados clínicos de *P. aeruginosa*

ANTIMICROBIANO	TZP	AZC	FEP	IPM	MEM	CN	TB	MK	CIP	LEV
Número de cepas (n=58)	34	43	25	43	42	37	35	29	35	29
Secreciones (n= 33)	17	24	11	21	21	17	17	13	16	13
Heridas (n= 2)	0	2	0	2	1	1	1	1	1	1
Fibrosis Quística (n= 3)	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2
Catéter Venoso Central (n= 8)	7	7	3	8	7	6	6	3	6	5
Sangre (n= 1)	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Orina (n= 7)	4	4	5	6	7	7	6	7	6	6
Tejido (n= 2)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Otros (n= 2)	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0

TZP: Piperacilina-Tazobactam, AZC: Ceftazidima, FEP: Cefepime

IPM: Imipenem, MEM:Meropenem, CN: Gentamicina, TB: Tobramicina

MK: Amikacina, CIP:Ciprofloxacina, LEV:Levofloxacino

La resistencia frente a antibióticos fue mayor para los carbapenems, así para Imipenem fue el 74,1 % (43/58) y para Meropenem el 72,4 % (42/58), a la Ceftazidima también el 74,1 % (43/58), seguido por la Gentamicina 63,8 % (37/58).

Capacidad de Formación de Biopelículas

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron sometidas a la evaluación por el método del Tubo. Esta investigación mostró una amplia diversidad en la capacidad de formación de biopelículas, como se puede apreciar en las Fotos 1 y 2.



FOTO 1. La calificación es para 1A: escaso, 3A: regular, 5A: abundante.

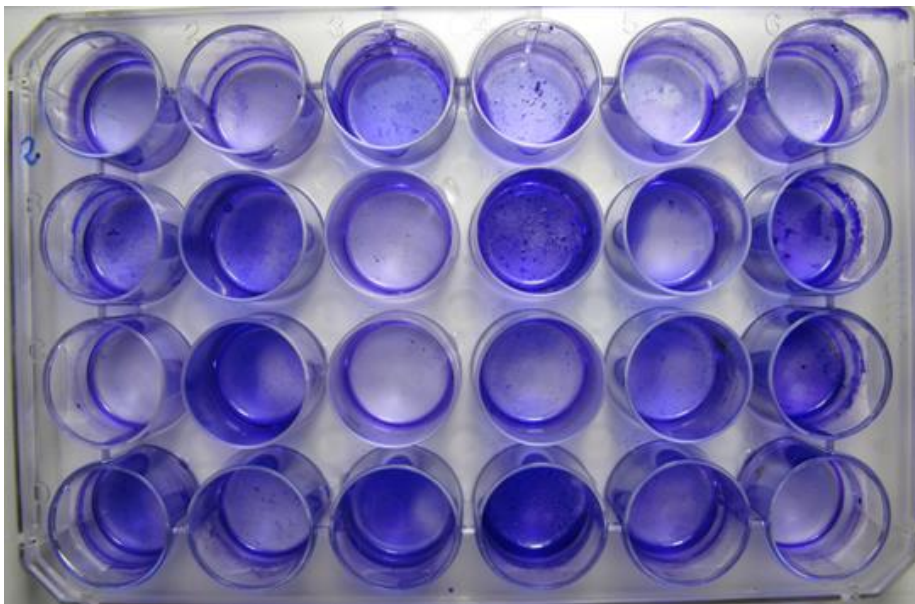
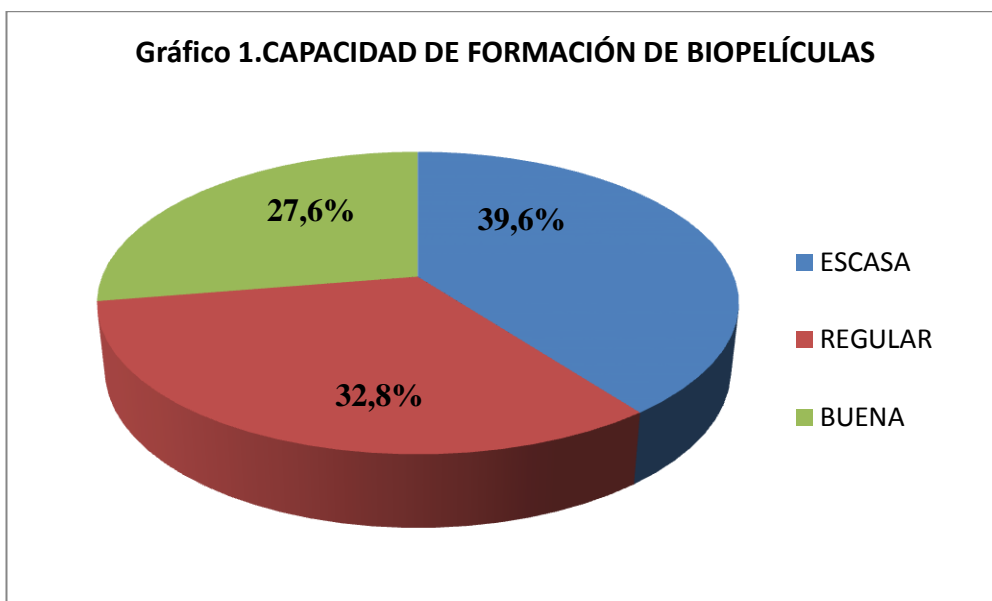


FOTO 2. Se pueden apreciar que las muestras de los pocillos 4B y 4D forman abundante biopelícula, para el método utilizado.

Se obtuvo que la mayoría de aislados (39,6%, 23/58) muestran escasa formación de biopelículas, 32,8 % (19/58) presentan una formación moderada o regular, mientras que el 27,6 % (16/58) tienen muy buena formación de biopelículas (Gráfico 1), el detalle de capa cepa se aprecia en la Tabla 5.



RESULTADOS DE MOTILIDAD:

Motilidad Tipo “Nado”

En agares semisólidos, las células bacterianas nadan a través de los canales llenos de agua para formar anillos quimiotácticos concéntricos, como se muestra en las Fotos 3 y 4.

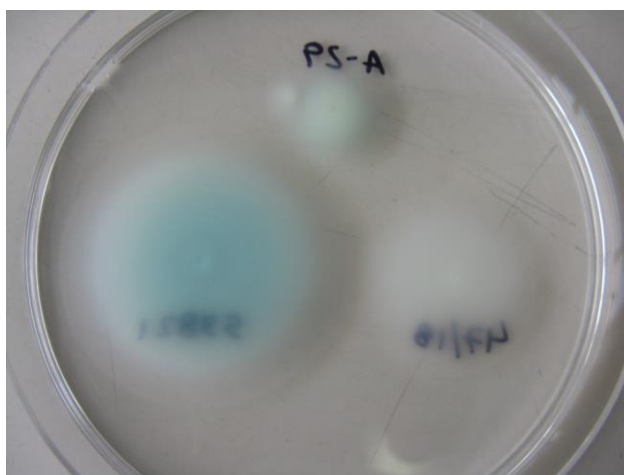


FOTO 3. Motilidad tipo “nado”. La cepa inferior izquierda muestra una buena motilidad.

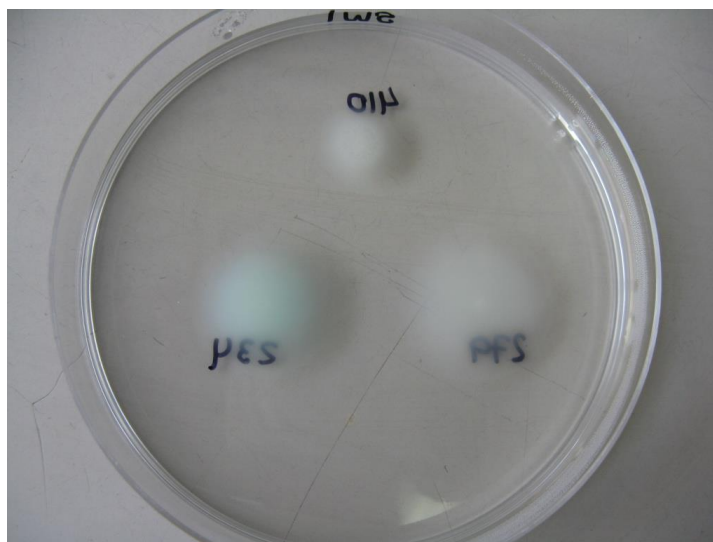


FOTO 4. La cepa inferior derecha presenta claramente una motilidad que se disemina hacia fuera del punto de siembra.

Motilidad Tipo “Enjambre”

Cuando se inoculó en agar al 0.5%, se pudo observar los bordes irregulares característicos en la periferia, a medida que crece la colonia (Fotos 5 y 6).

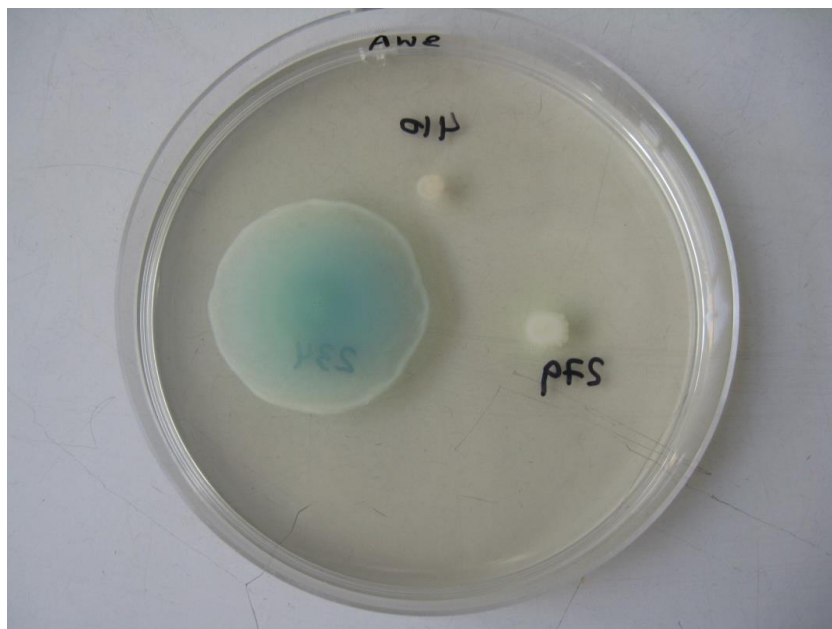


FOTO 5. Motilidad tipo “enjambre”. Evidente excelente motilidad de este tipo en cepa inferior izquierda de la placa mostrada.



FOTO 6. Motilidad tipo “enjambre”. Buena motilidad de muestra vista en parte superior de la placa mostrada.

Motilidad Tipo “Contracción”

Para este tipo de motilidad, en la Foto 7 se pueden apreciar las colonias con diferentes morfologías.



FOTO 7. Motilidad tipo “contracción”. Colonia superior e inferior izquierda aparentemente con buena motilidad mediada por pili.

En las cepas con motilidad tipo “contracción” las colonias tienen una morfología que se va difundiendo (Foto 8B), mientras que las cepas que no la tienen forman colonias redondeadas (Foto 8A). Las zonas de “contracción” se forman justo bajo el agar, éstas pueden visualizarse removiendo el agar y coloreando a la bacteria adherida al plástico de la placa con cristal violeta, como se aprecia en la Foto 8 (C y D).

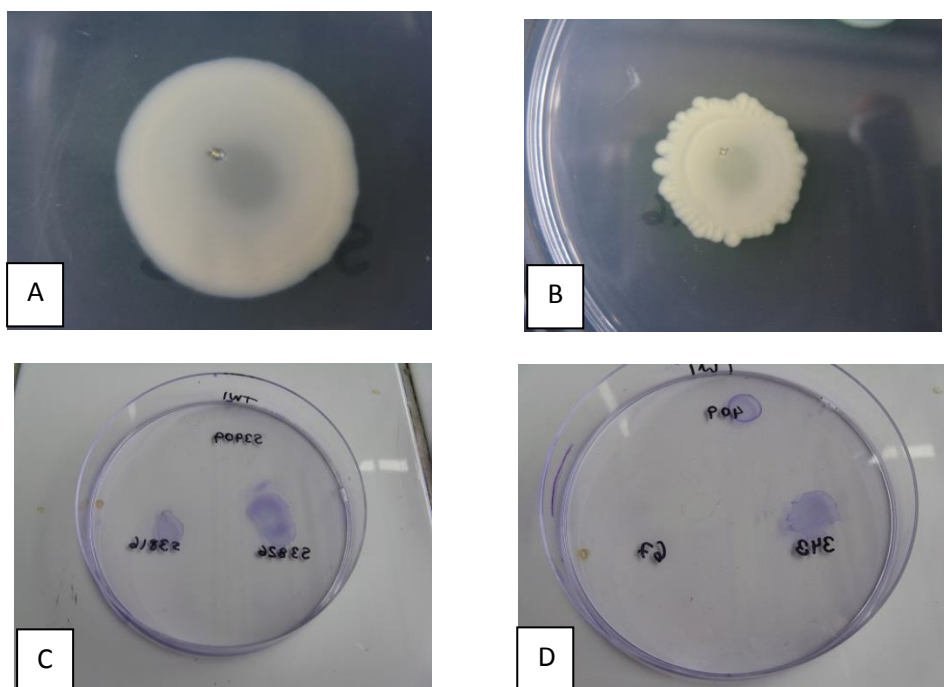


FOTO 8. Motilidad “contracción”. A: Crecimiento pero sin motilidad de este tipo, evidenciado porque no hay tinción al retirar el agar (parte superior de C). B: Evidente crecimiento con motilidad evidenciada en la tinción inferior derecha de D.

En las cepas que pueden realizar la motilidad tipo “contracción” se puede observar círculos teñidos que representan las células que se han movido alejándose del punto de inoculación.

De los 58 aislados, 11 (19 %) no presentan la motilidad tipo “nado”, mientras que dentro de los que lo pueden realizar el 6,9 % (4/58) presentan excelente migración desde el punto de siembra.

Respecto a la motilidad tipo “enjambre” todos los aislados lo presentan aunque en diferentes grados, así 9 (15,5 %) migran más allá de 10 mm. y sólo un aislado migra 30 mm.

La motilidad más relacionada con la presencia de T4P, es decir el tipo “contracción” aparentemente la presentaban todas las cepas en mayor o menor grado, pero con la tinción se confirmaron sólo 22 (37,9 %) aislados.

En la Tabla 5, se muestra la habilidad de formación de biopelículas entre los diferentes aislados, así como los resultados de los diferentes tipos de motilidades.

TABLA 5. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y TIPOS DE MOTILIDAD

MUESTRA	Capacidad de formar biopelícula	TIPO DE MOVIMIENTO (mm)			
		"Nado"	"Enjambre"	"Contracción"	Tinción para observar motilidad tipo "contracción"
1	Escaso	45	14	5	Ninguno
2	Escaso	35	4	3	Ninguno
3	Bueno	49	4	4	Ninguno
4	Bueno	2	3	4	Ninguno
5	Regular	3	5	7	Ninguno
6	Regular	48	4	4	Ninguno
7	Regular	13	15	6	Ninguno
8	Bueno	12	5	6	Ninguno
9	Regular	1	4	10	Ninguno
10	Escaso	2	3	12	Poco
11	Escaso	12	14	17	Bueno
12	Bueno	5	16	5	Bueno
13	Escaso	0	5	2	Ninguno
14	Escaso	15	4	10	Ninguno
15	Bueno	10	5	5	Ninguno
16	Regular	0	4	4	Ninguno

MUESTRA	Capacidad de formar biopelícula	TIPO DE MOVIMIENTO (mm)			
		"Nado"	"Enjambre"	"Contracción"	Tinción para observar motilidad tipo "contracción"
17	Escaso	8	30	12	Regular
18	Bueno	0	4	7	Ninguno
19	Bueno	0	4	5	Ninguno
20	Regular	18	5	6	Ninguno
21	Escaso	10	4	4	Ninguno
22	Regular	11	5	5	Ninguno
23	Escaso	19	6	7	Ninguno
24	Escaso	9	7	3	Bueno
25	Bueno	0	3	5	Ninguno
26	Escaso	5	6	10	Bueno
27	Regular	16	7	6	Bueno
28	Regular	12	5	4	Poco
29	Escaso	0	3	5	Ninguno
30	Bueno	9	3	7	Ninguno
31	Bueno	18	5	4	Ninguno
32	Regular	21	5	6	Ninguno
33	Regular	22	4	7	Bueno
34	Escaso	7	3	5	Ninguno
35	Bueno	5	3	6	Ninguno
36	Bueno	0	2	3	Poco
37	Regular	0	5	5	Ninguno
38	Escaso	0	3	5	Ninguno
39	Regular	0	2	5	Bueno
40	Bueno	6	3	5	Ninguno
41	Regular	0	2	4	Ninguno
42	Escaso	10	6	4	Ninguno
43	Bueno	8	5	3	Bueno
44	Bueno	15	10	35	Bueno
45	Escaso	10	11	4	Ninguno
46	Regular	5	4	4	Ninguno
47	Escaso	4	4	8	Ninguno
48	Regular	15	2	8	Poco
49	Escaso	4	10	9	Poco
50	Escaso	2	10	2	Poco
51	Regular	6	4	2	Poco
52	Bueno	2	4	2	Poco
53	Escaso	15	7	9	Ninguno
54	Escaso	11	5	15	Bueno
55	Escaso	14	5	14	Ninguno
56	Escaso	9	7	13	Poco
57	Regular	3	4	11	Poco
58	Regular	5	6	12	Bueno

Resultados para la Amplificación del Gen *pilA* Y Genes Accesorios:

Al amplificar la región comprendida entre *pilB* y tARN-Thr, todas las cepas dieron una sola banda. Aquellas muestras que tuvieron amplicones de mayor peso fueron nuevamente amplificadas en busca de genes accesorios a *pilA* (Fotos 7 y 8).

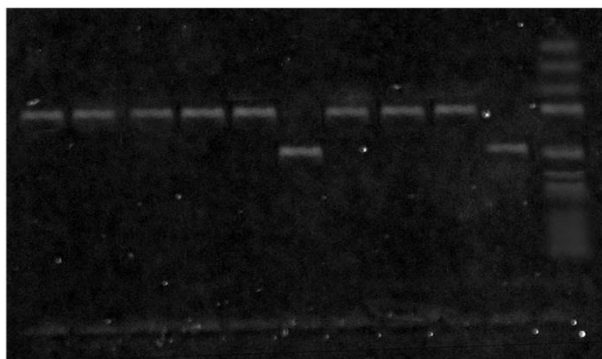


FOTO 9. Se puede apreciar que las muestras A, B, C, D, E, G, H e I presentan amplicones de menor peso molecular, lo que indica que sólo presentan el gen *PilA*. Mientras que las muestras F y J son de mayor peso molecular, lo que nos indica la presencia de un gen accesorio.



FOTO 10. Las muestras B, C y F presentan mayor peso molecular lo que nos indica que además del gen *PilA* presentan un gen accesorio.

Aquellas muestras que presentaron mayor peso molecular, fueron amplificadas en busca del gen(es) accesorio(s), como se aprecia en las Fotos 11 y 12.

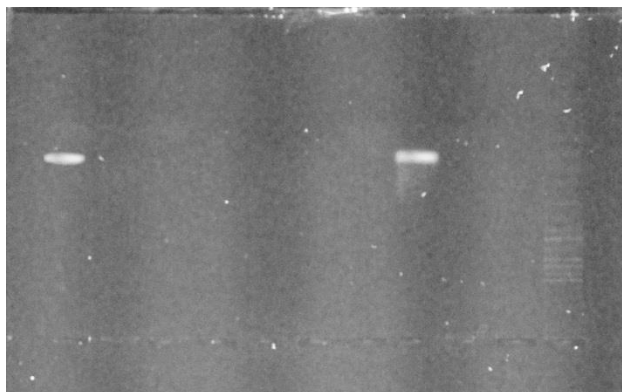


FOTO 11. Las muestras evaluadas para cuatro genes accesorios, evidenciaron cada una un amplicón correspondiente a un genotipo diferente. La muestra A dio un amplicón para el gen *tfpO* y la muestra B dio para el gen *tfpY*.

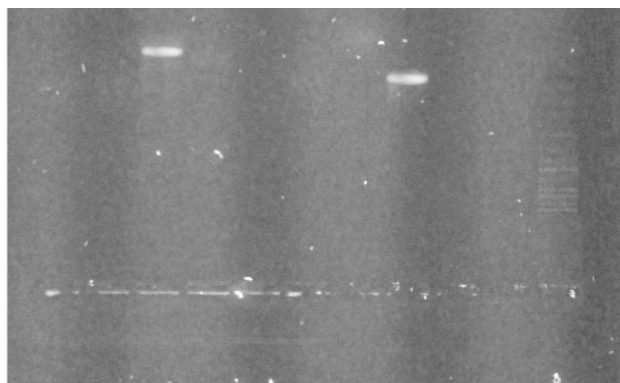


FOTO 12. Las muestras que se muestran, evidenciaron cada una un amplicón correspondiente a un genotipo diferente. La muestra C dio un amplicón para el gen *tfpY* y la muestra D dio para el gen *tfpZ*.

La Tabla 6, resume la presencia de los diferentes genes en cada cepa aislada de *Pseudomonas aeruginosa*.

TABLA 6. Presencia de Genotipos de T4P en *P. aeruginosa*

Muestra	Sólo Pila	GENES ACCESORIOS				
		TfpO	TfpO2	TfpX	TfpY	TfpZ
1					(+)	
2	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
3					(+)	
4	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
5					(+)	
6					(+)	
7	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
8		(+)				
9					(+)	
10	(+)					
11		(+)				
12	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
13					(+)	
14	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
15		(+)				
16					(+)	
17	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
18	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
19	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20						(+)
21		(+)				
22				(+)		
23		(+)				
24		(+)				
25				(+)		
26	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
27				(+)		
28	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
29			(+)			
30						(+)
31		(+)				
32				(+)		
33				(+)		
34	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
35	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
36	(+)					
37						(+)
38						(+)
39						(+)
40						(+)

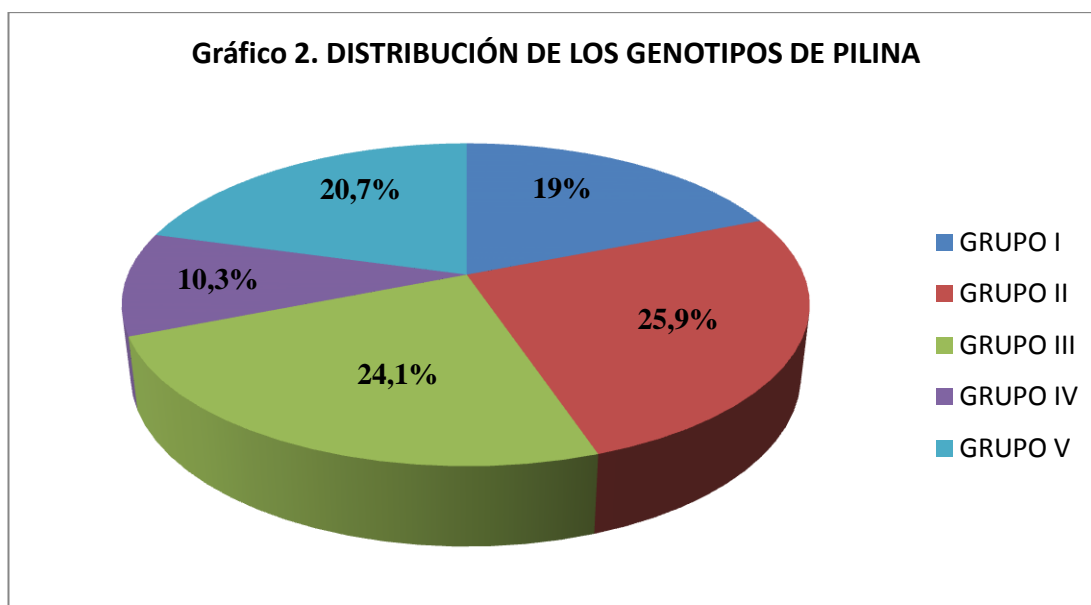
Muestra	Sólo PilA	GENES ACCESORIOS				
		TfpO	TfpO2	TfpX	TfpY	TfpZ
41	(+)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
42						(+)
43						(+)
44						(+)
45					(+)	
46					(+)	
47					(+)	
48						(+)
49					(+)	
50				(+)		
51		(+)				
52		(+)				
53					(+)	
54					(+)	
55		(+)				
56						(+)
57					(+)	
58						(+)

N.A. (No aplica)

En cuanto a la distribución de genotipos, 25,9 % (15/58) presentaron sólo el gen pilA. El resto de muestras presentaron genes accesorios, así el tfpO lo presentaron el 19 % (11/58), el tfpY 24,1 % (14/58), el tfpWX 10,3 % (6/58) y finalmente el gen tfpZ lo presentaron el 20,7 % (12/58), tal como se aprecia en la Tabla 7 y Gráfico 2.

TABLA 7. Distribución de genotipos de pilina entre los diferentes aislados clínicos

Genotipos de Pilina	I	II	III	IV	V
Gen(es) Accesorio (s)	tfpO	Ninguno	tfpY	tfpWX	tfpZ
Número de cepas (n=58)	11	15	14	6	12
Secreciones (n= 33)	6	6	8	5	8
Heridas (n= 2)	0	1	0	0	1
Fibrosis Quística (n= 3)	2	0	0	1	0
Catéter Venoso Central (n= 8)	1	2	4	0	1
Sangre (n= 1)	1	0	0	0	0
Orina (n= 7)	0	5	1	0	1
Tejido (n= 2)	1	0	0	0	1
Otros (n= 2)	0	1	1	0	0



DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que puede causar infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos, y esto posiblemente esté relacionado con los factores de virulencia que le favorezcan en un inicio el establecimiento seguido por la colonización, es por ello que la presente tesis pretende contribuir al conocimiento de los factores de virulencia que estén relacionados al movimiento y a la formación de biopelículas en cepas aisladas en hospitales de nuestro país.

En la evaluación antimicrobiana, no hay una respuesta patrón entre las cepas que tienen buena capacidad de formar biopelículas y la resistencia frente a antibióticos, esto no nos debe sorprender pues el antibiograma se da con el estado plactónico de la bacteria. Pero esta realidad puede ser muy diferente *in vivo* por muchos factores, por ejemplo, si la bacteria forma la biopelícula, puede darse una resistencia porque el antibiótico no puede penetrar la capa polisacárida que la rodea, o la bacteria que se encuentra dentro posee un metabolismo lento lo que la hace resistente o tal vez, puede darse algún intercambio genético entre cepas dentro de la biopelícula

adquiriéndose genes de resistencia. También Southey-Pillig CJ ⁴⁰, reportaron que el proceso de desarrollo de biopelículas parece estar acompañado por un incremento progresivo en la producción de proteínas relacionadas con la resistencia a antibióticos y la virulencia, mostrando que las características de las biopelículas pueden desarrollarse durante el curso del desarrollo de la misma. Y Haussler ⁷² reportó que sus hallazgos implican que en las biopelículas hay una incrementada emergencia de variación que origina una población diversa debido a la presión selectiva inherente a las biopelículas y que ayudan a estas comunidades a sobrevivir en ambientes adversos, esta diversidad es consecuencia de mutaciones espontáneas durante el crecimiento u otros procesos que facilitan la evolución de variantes genéticas en las biopelículas bacterianas.

Pero, por otro lado, la cepa podría también ser sensible *in vivo* teniendo la capacidad de formar biopelículas y esto es porque no ha tenido la oportunidad de formar la biopelícula *in vivo*, posiblemente porque no se pudo adherir a alguna superficie, como primer requisito para la formación de biopelículas, lo que llama a reflexionar que la adhesión, mediada tanto por flagelo como por T4P, podría ser un blanco importante a considerar para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. A lo mencionado se añade que las células plactónicas, como tales, pueden tener genes de resistencia intrínseca lo que complica aún más las terapias sobretodo en pacientes críticos.

La producción de biopelículas ha sido considerada como un importante determinante de patogenicidad en las infecciones causadas por esta bacteria. Los ensayos en las microplacas para la formación de biopelículas mostraron un amplio rango para dicha formación desde fenotipos que no lo formaban hasta aquellos que las formaban eficientemente. El método para la detección de biopelículas utilizado muestra que esta propiedad no está directamente relacionada con la presencia de determinado tipo de motilidad, pues no hay algún resultado que muestre que una cepa que presenta mayor habilidad respecto a algún tipo de motilidad también presente mayor capacidad de formación de biopelícula, lo que podría estar fundamentado por lo revisado por Flemming y Wingender ⁷³ que mencionan que los apéndices proteináceos tales como pili y flagelos podrían actuar más como elementos estructurales de las biopelículas principalmente por la interacción con los componentes exopolisacáridos de la matriz, tal es así que el T4P se une al ADN y

posiblemente ayude a la unión con otras estructuras, o como reportó Klausen⁷⁴ en el 2003, que la motilidad “contracción” vía T4P, serviría para la agregación bacteriana formando las microcolonias iniciales.

También Caiazza et al.⁷⁵ mencionan que en la formación temprana de la biopelícula, la motilidad tipo “enjambre” ayudaría en determinar la estructura final de la misma. A lo mencionado, podría además adicionarse que el comportamiento de las bacterias *in vivo* podría ser muy diferente a lo trabajado *in vitro*, como sostienen O’Toole y Kolter⁷⁰ cuando comentan que el pili es un factor de virulencia importante que está directamente implicado en la adherencia bacteriana a la superficie de las células eucarióticas.

McDougald et al.⁷⁵ mencionan que éstas organelas de motilidad más bien podrían estar relacionadas con la etapa de dispersión de la biopelículas ya que se ha reportado que en dicha etapa disminuye la regulación de los genes que codifican los exopolisacáridos, mientras que los genes que codifican factores importantes para la motilidad como es el flagelo están más regulados. Existen varios reportes que sostienen que la virulencia de algunos patógenos está reducida cuando crecen dentro de las biopelículas, pero Von Gotz et al.⁷⁷ hallaron que algunas variantes de pequeñas colonias, aisladas de pacientes con fibrosis quística infectados, tienen tanto la capacidad de formar biopelículas así como una incrementada expresión génica del T3SS y citotoxicidad.

O’May y Tufenkji⁷⁸ en un trabajo realizado demostraron que muchas bacterias plactónicas son capaces de iniciar la colonización en la superficie utilizando el flagelo para “nadar” hacia la superficie y luego adherirse a través de adhesinas bacterianas, tales como el T4P y el mismo flagelo. Posiblemente el tipo “enjambre” sea un movimiento más rápido y podría permitir a la bacteria colonizar la superficie entera dentro de pocas horas de iniciado el evento. En la presente tesis, las cepas que han presentado mejor motilidad tipo “enjambre” corresponden a diferentes muestras clínicas, desde CVC y secreciones hasta orina, y es probable que los episodios clínicos en los pacientes de los que se han aislado estas cepas hayan tenido una rápida manifestación de infección.

Las dos formas de motilidad superficial, “nado” y “contracción” se han reportado en *P. aeruginosa* y la motilidad “enjambre” mediada por flagelo se ha descrito en otras

bacterias como *Proteus mirabilis*, pero *Pseudomonas* también puede realizarlo, especialmente en pacientes críticos, así nuestros resultados reportaron que todas las cepas aisladas presentaron esta motilidad aunque en diferentes grados, lo que nos sugiere que cualquier cepa es igualmente capaz de colonizar o infectar bajo determinadas condiciones. Yeung et al.⁴⁶ mencionan que hay una relación entre la motilidad tipo “enjambre” y la formación de biopelículas, lo que no coincide con lo hallado en el presente trabajo, donde bacterias con una escasa motilidad “enjambre” presentaron en algunos casos buena formación de biopelículas, pero esto coincide también con lo encontrado por otros investigadores, así Caiazza et al.⁷⁵ concluyen en su trabajo que algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que carecen de los genes para la producción de polisacáridos y formación de biopelículas muestran una motilidad “enjambre” incrementada, como lo encontrado en la cepa 17, mientras que existen cepas con incrementada producción de exopolisacárido pero el movimiento “enjambre” es escaso, como se puede apreciar en esta tesis, donde las cepas que tienen buena capacidad de formar biopelículas tienen un movimiento tipo “enjambre” débil.

Esto podría deberse a que posiblemente esta relación también podría verse influenciada por otros factores como el “quorum sensing”, nutrientes disponibles, etc. por lo que se podría decir que en sí la motilidad juega un rol importante en la patogénesis de *Pseudomonas aeruginosa* y es crucial para la colonización. Aunque es importante considerar, lo mencionado por Amiel et al.⁴⁸ que reportan que sus resultados dieron nuevos alcances en observaciones clínicas de *P. aeruginosa* y la pérdida de motilidad y demostraron que las cepas que carecen de la motilidad “nado” son resistentes a la fagocitosis *in vivo*, dato importante para comprender la ventaja inmunológica de esta bacteria en infecciones crónicas

En este estudio también se estudia la caracterización genética relacionada con la codificación del T4P posiblemente importante para las etapas iniciales de la formación de biopelículas, el cual se añade a la lista creciente de factores de virulencia relacionados a su formación. Esta relativa heterogeneidad de los factores de virulencia ampliamente estudiados por diferentes grupos de investigadores así como en la presente tesis es acorde con la naturaleza conservada del genoma de *P. aeruginosa*.

Una característica importante de los resultados fue el hallazgo de que los genotipos del grupo II son relativamente los más comunes entre los aislados clínicos, indicando una mejor conservación de los antígenos de superficie. Ello está sujeto a variación en otras especies, lo cual podría deberse a que esta bacteria es ubicua propia del ambiente comparada con los que sí son patógenos obligados.

Los genotipos del grupo I se encuentran distribuidos de una manera homogénea entre las cepas que provienen de secreciones, pero habría que investigarse más en muestras provenientes de otras fuentes, así, Kus et al. en el 2004 ⁷, reportaron que este grupo es más prevalente en pacientes con FQ, para el presente trabajo, de tres muestras de fibrosis quística, dos pertenecen a este grupo, por lo que se postula que podría tener un rol importante en modular la unión célula-célula o en proteger la porción adhesiva del T4P de la degradación proteolítica, aunque Castric y Deal ⁷⁹ mostraron que su ausencia no tiene consecuencias aparentes en la expresión del T4P.

Los genotipos pertenecientes al grupo III, se presentó en secreciones, seguido por presencia en CVC, mientras que en el trabajo de Kus et al. ⁷ predominó en muestras provenientes de hisopados rectales. Asykan et al. ⁵⁵ demostraron que la inactivación de tfpY podría manifestarse como defectos en el ensamblaje de T4P y la retracción alterada. El grupo IV es el menos frecuente de los genotipos, pero se puede presentar casi con las mismas probabilidades que otros en las muestras provenientes de secreciones, lo que es muy diferente de los resultados de los mismos investigadores quienes casi no encontraron la presencia de dicho genotipo, y finalmente, el grupo V, también mayormente hallado en secreciones, pero con probabilidad de encontrarse en otros tipos de muestras.

La presencia de los diversos genotipos podría ser porque las estructuras antigénicas de la superficie están expuestas al ambiente, y T4P también está sujeto a la selección evolucionaria para la variación, según Asikyan et al. ⁵⁵ esto puede ocurrir por mutaciones puntuales, recombinación intragénica, por modificaciones postranslacionales y por transferencia génica entre especies.

La expresión de genes de virulencia en una infección dada es muy importante en la capacidad de que una *P.aeruginosa* aislada se establezca y mantenga la infección. Sin embargo, Bradbury et al. ⁸⁰ hicieron una revisión llegando a concluir que un número de estudios previos han investigado potenciales asociaciones entre la

presencia o ausencia de genes de los factores de virulencia y diferentes tipos de infección.

Hay una amplia variabilidad en los resultados fenotípicos, pero esto no disminuye la validez de los hallazgos, ya que mostraría que áreas geográficas específicas tendrían diferentes genotipos de *P.aeruginosa* presentes, tal es así que se ha encontrado mayor presencia del grupo IV, y además existen factores tales como los antibióticos usados en el tratamiento de enfermedades específicas que podrían alterar significativamente el genotipo de las cepas infectantes. La relativa heterogeneidad de los genes de virulencia estudiados es acorde con la elevada versatilidad de la bacteria estudiada.

Finalmente, los resultados serán útiles para el diseño de potenciales fármacos y/o vacunas dirigidas contra ésta organela, que podrán ser usadas en nuestro país, ya que hay una distribución homogénea de los diferentes genotipos, considerando además que el genotipo del grupo IV, se encuentra también, como los otros genotipos, a diferencia de los trabajos previos, lo que se consideraría para los posibles diseños.

CONCLUSIONES

La distribución de genotipos en los aislados de *P. aeruginosa* de muestras clínicas fue, 25,9 % (15/58) sólo tienen el gen pilA (Grupo II), 19 % (11/58) presentaron el gen accesorio tfpO (Grupo I), 24,1 % (14/58) el gen accesorio tfpY (Grupo III), 10,3 % (6/58) el gen accesorio tfpWX (Grupo IV) y el gen tfpZ accesorio (Grupo V) lo presentaron el 20,7 % (12/58).

La resistencia frente a antibióticos fue mayor para los carbapenems, así para Imipenem fue 74,1 % (43/58) y para Meropenem 72,4 % (42/58), Ceftazidima 74,1 % (43/58) y para Gentamicina 63,8 % (37/58).

La capacidad de formación de biopelículas fue abundante en 16 cepas (27,6 %), regular en 19 (32,8 %) y escasa en 23 (39,6 %).

De los 58 aislados, 11 (19 %) no presentaron la motilidad tipo “nado”, mientras que 4 (6,9 %) presentaron excelente migración. La motilidad tipo “enjambre” lo presentaron todas las cepas, pero 9 (15,5 %) migraron más allá de 10 mm. y sólo un aislado migró 30 mm. La motilidad tipo “contracción” lo presentaron sólo 22 (37,9 %) aislados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Déziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. *J. Bacteriol.* 2001; 183(4): 1195-1204.
2. Yahr TL, Greenberg EP. The generic basis for the commitment to chronic versus acute infection in *P. aeruginosa*. *Mol. Cell.* 2004; 16: 497-8.
3. Mikkelsen H, Bond NJ, Skindersoe ME, Givskov M, Lilley KS, Welch M. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2009; 155: 687-98.
4. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 1140-54.
5. Korgaonkar A, Trivedi U, Rumbaugh K, Whiteley M. Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(3): 1059-64.
6. Aujoulat F, Lebreton F, Romano S, Delage M, Marchandin H, Brabet M, Bricard F, Godreuil S, Parer S, Jumas-Bilak E. Comparative diffusion assay to assess efficacy of topical antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* in burns care. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2011; 10 (27):1-10.
7. Kus J, Tullis E, Cvitkovitch D, Burrows L. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology.* 2004; 150:1315-1326.
8. Schaber JA, Hammond A, Carty N, Williams S, Colmer-Hamood J, Burrowes B, Dhevan V, Griswold J, Hamood A. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56: 738-748.
9. Khuntayapom P, Montakantikul P, Mootsikapun P, Thamlikitkul V, Traidej M. Prevalence and genotypic relatedness of carbapenem resistance among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in tertiary hospitals across Thailand. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobial.* 2012; 11(25):1-7.

10. Rivera M, Rodríguez C, Huayán G. *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un Servicio de Neonatología. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2008; 25(2): 250-52.
11. Instituto Nacional de Salud. Boletín Semanal. Año 6 N° 132. Lima. INS. 13 de agosto 2009.
12. MINSA. Boletín Epidemiológico. Lima: 2011. Setiembre, Vol. 1 N°1.
13. Castilla G. Epidemiología de infecciones respiratorias en pacientes con Fibrosis Quística en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. Rev. Peru. Pediatr., mayo/agost. 2008; 61(2): 82-9.
14. Popper KR. La lógica de la investigación científica. 1ra. ed. Madrid: Editorial Tecnos; 1962.
15. Bernal, C. Metodología de la Investigación. Tercera edición. Santafé de Bogotá: Prentice Hall; 2010.
16. Emam A, Yu AR, Park HJ, Mahfoud R, Kus J, Burrows LL, Lingwood CA. Laboratory and clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains do not bind glycosphingolipids *in vitro* or during type IV pili-mediated initial host cell attachment. Microbiology. 2006; 152: 2789-99.
17. Mikkelsen H, Duck Z, Lilley KS, Welch M. Interrelationships between colonies, biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2007; 189(6): 2411-16.
18. Miller RM, Tomaras AP, Barker AP, Voelker DR, Chan ED, Vasil AI, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility-mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: specificity and metabolic requirements. J. Bacteriol. 2008; 190 (11): 4038-49.
19. Craig L, Li J. Type IV Pili: Paradoxes in form and function. Curr. Opin. Struct. Biol. 2008; 18(2): 267-77.
20. Murray TS, Ledizet M, Kazmierczak B. Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. J. Med. Microbiol. 2010; 59: 511-20.
21. Conrad J. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. Res. Microbiol. 2012; 163: 619-29.
22. Kim S, Rahman M, Yong Seol S, Sun Yoon S, Kim J. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PA1 Ø requires type IV pili for infection and shows broad bactericidal and biofilm removal activities. Appl. Environ. Microbiol. 2012; 78(17): 6380-85.

23. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. Quinta edición. Barcelona: Elsevier; 2006.
24. Chugani S, Sik Kim B, Phattarasukol S, Brittnacher M, Ho Choi S, Harwood C, Greenberg P. Strain-dependent diversity in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012; 109 (41): E2823-31.
25. Stover, C. K, Pham, X. Q, Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D, Warrenner P, Hickey, MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000; 406: 959-64.
26. Wozniak D, Keyser R. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. Chest. 2004; 125(2) Supl: 62S-69S.
27. Allydice-Francis K, Brown P. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. Int. J. Microbiol. 2012; 1-7.
28. Mikkelsen H, Bond N, Skindersoe M, Givskov, Lilley K, Welch M. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 2009; 155: 687-98.
29. Angus A, Ackerman A, Augustin D, Lee E, Evans D, Fleiszig S. *Pseudomonas aeruginosa* induces membrane blebs in epithelial cells which are utilized as a niche for intracellular replication and motility. Infect. Immun. 2008; 76(5): 1992-2001.
30. Donlan RM. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. Clin Infect Diseases. 2011; 52 (8): 1038-45.
31. Kirisits M, Prost L, Starkey M, Parsek M. Characterization of Colony Morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. App.Environ. Microbiol. 2005; 71(8): 4809-21.
32. Andréia BE, Wolf-Rainer A. Combining Biofilm-Controlling compounds and antibiotics as a promising new way to control biofilm infections. Pharm. Res. 2010; 3: 1374-93.
33. Kadam R, Bergmann M, Hurley M, Garg D, Cacciarini M, et al. A glycopeptides dendrimer inhibitor of the galactose-specific lectin LecA and of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2011; 123:1-6.

34. Bowler L, Zhanel G, Ball B, Saward L. Mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(9): 4976-79.
35. Bagge N, Hentzer M, Andersen J, Ciofu O, Givskov M, Hoiby N. Dynamics and spatial distribution of β -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (4): 1168-74.
36. Ghafoor A, Hay Iain, Rehm B. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm formation and architecture. *App. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (15): 5238-5246.
37. Kievit T. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(2): 279-88.
38. Kuchma S, Connolly J, O'Toole G. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2005; 187 (4): 1441- 54.
39. Haubler S. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 2004; 6 (6): 546-51.
40. Southey-Pillig C, Davies D, Sauer K. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* 2005; 187 (23): 8114-26.
41. Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(7): 1666-1681.
42. Vallet I, Olson J, Lory S, Lazdunski A, Filloux A. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Microbiology.* 2001; 98(12): 6911-16.
43. Schaber JA, Triffo W, Jin Suh S, Oliver J, Hastert M, Griswold J, Auer M, Hamood A, Rumbaugh K. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independt of cell-to-cell signaling. *Infect. Immun.* 2007; 75 (8): 3715-3721.
44. Lewis K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2001; 45(4): 999-1007.
45. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Patholog. Microbiol. Immun.* 2007; 115: 891-9.

46. Yeung AT, Torfs EC, Jamshidi F, Bains M, Wiegand I, Hancock RE, Overhage J. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. J.Bacteriol. 2009; 191(18): 5592-5602.
47. Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. Nature Rev. 2010; 8: 634-44.
48. Amiel E, Lovewell R, O'Toole G, Hogan D, Berwin B. *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. Infect. Immun. 2010; 78(7): 2937-2945.
49. Balloy V., Verma A., Kuravi S, Si-Tahar M, Chignard M. & Ramphal R. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 2007; 196, 289–96.
50. Overhage J, Lewenza S, Marr A K. & Hancock R. E. Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. J Bacteriol. 2007; 189, 2164–2169.
51. Rashid MH., and Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97:4885–4890.
52. Danne C, Dramsi S. Pili of Gram-positive bacteria: roles in host colonization. Res. Microbiol. 2012; 163: 645-658.
53. Fronzes R, Remaut H, Waksman G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. The EMBO Journal. 2008; 27: 2271-2280.
54. Bulyha I, Schmidt C, Lenz P, Jakovjevic V, Hone A, Maier B, Hoppert M, Sogaard-Andersen L. Regulation of the type IV pili molecular machine by dynamic localization of two motor proteins. Mol. Microbiol. 2009; 74 (3): 691 – 706.
55. Asikyan ML, Kus J, Burrows L. Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 2008; 190 (21): 7022-34.
56. Wehbi H, Portillo E, Harvey H, Shimkoff AE, Scheurwater EM, Howell PL, Burrows LL. The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. J. Bacteriol. 2011; 193 (2): 540-50.
57. Belete B, Lu H, Wozniak D. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR regulates Type IV pilus biosynthesis by activating transcription of the fimU-pilVWXYZ1Y2E Operon. J. Bacteriol. 2008; 190(6): 2023-2030.

58. Proft T, Baker EN. Pili in gram-negative and Gram-positive bacteria-structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66: 613-35.
59. Bentzmann S, Arouze M, Ball G, Fillux A. FppA, a novel *Pseudomonas aeruginosa* prepilin peptidase involved in assembly of type IVb pili. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (13): 4851-60.
60. Giltner C, Van Schalk E, Audette G, Kao D, Hodges R, Hassett D, Irvin R. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesion for both biotic and abiotic surfaces. *Mol. Microbiol.* 2006; 59(4): 1083-1096.
61. Koo J, Tammam S, Ku SY, Sampaleanu LM, Burrows L, Lynne P. PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus secretin. *J. Bacteriol.* 2008; 190 (21): 6961-69.
62. Ramos JL, Levesque RC. *Pseudomonas*. Volume 4. Granada: Springer; 2006.
63. Giltner C, Raa N, Lunardo M, Hussain A, Burrows L. Evolutionary and functional diversity of the *Pseudomonas* type IVa pilin island. *Environ. Microbiol.* 2011; 13(1): 250-64.
64. Ramos JL, Filloux A. *Pseudomonas*. Volume 5. Granada: Springer; 2007.
65. Harvey H, Kuz J, Tessier L, Kelly J, Burrows L. *Pseudomonas aeruginosa* D-arabinofuranose biosynthetic pathway and its role in type IV pilus assembly. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (32): 28128-137.
66. Reece Richard J. *Analysis of genes and genomes*. Primera edición. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.; 2004.
67. Schuller Margret, Sloots Theo, James Gregory, Halliday Catriona, Carter Ian. *PCR for Clinical Microbiology*. 2010. Springer Science. Australia.
68. Instituto Nacional de Salud. *Manual de procedimientos bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias*. Serie de Normas Técnicas N° 28. Lima. INS. 2005.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. M100-S22. Vol. 32 N° 3.

70. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28:449-61.
71. Goldberg JB, Ohman DE. Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J Bacteriol.* 1984; 158, 1115-21.
72. Haussler S. Multicellular signaling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Medic Microbiol.* 2010; 300: 544-48.
73. Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Rev.* 8: 623-33.
74. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 2003; 48 (6): 1511-24.
75. Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M. & O'Toole, G. A. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol.* 2007; 189: 3603-12.
76. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Rev.* 2012; 10: 39-50.
77. Von Gotz F, Haussler S, Jordan D, Saravanamth S, Wehmhoner D, Strussman A, et al. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 3837-47.
78. O'May C, Tufenkji N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry prothocyanidins and other Tannin-containing materials. *App. Environ. Microbiol.* 2011; 77(9): 3061-67.
79. Castric PA, Deal CD. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* pili based on sequence and B-cell epitope analyses. *Infect. Immun.* 1994; 62 (2): 371-76.
80. Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, Reid DW, Champion AC. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Medic Microbiol.* 2010; 59: 881-90.

ANEXO 1.

TABLA 8. PROCEDENCIA CLÍNICA DE LAS CEPAS

CEPA	SITIO DE AISLAMIENTO
1	CVC
2	CVC
3	CVC
4	Secreción traqueal
5	Aspirado endotraqueal
6	Secreción traqueal
7	Aspirado traqueal
8	Aspirado traqueal
9	Orina
10	Orina
11	Secreción
12	CVC
13	Secreción traqueal
14	Aspirado bronquial
15	Secreción traqueal
16	CVC
17	Orina
18	Orina
19	Orina
20	Aspirado endotraqueal
21	Secreción traqueal
22	Secreción ocular
23	Sangre
24	Aspirado endotraqueal
25	Abceso pancreático
26	Secreción bronquial
27	Aspirado endotraqueal
28	Líquido biliar
29	Tejido
30	Aspirado endotraqueal
31	CVC
32	Aspirado endotraqueal
33	Aspirado bronquial
34	Secreción de herida operatoria
35	Aspirado bronquial
36	Orina
37	Aspirado endotraqueal
38	CVC
39	Tejido
40	Aspirado bronquial

41	Aspirado bronquial
42	Aspirado bronquioalveolar
43	Orina
44	Aspirado bronquial
45	Aspirado endotraqueal
46	CVC
47	Secreción nasal
48	Aspirado endotraqueal
49	Líquido peritoneal
50	Aspirado traqueal (FQ)
51	Aspirado traqueal (FQ)
52	Aspirado traqueal (FQ)
53	Secreción
54	Secreción
55	Secreción
56	Secreción
57	Secreción
58	Herida